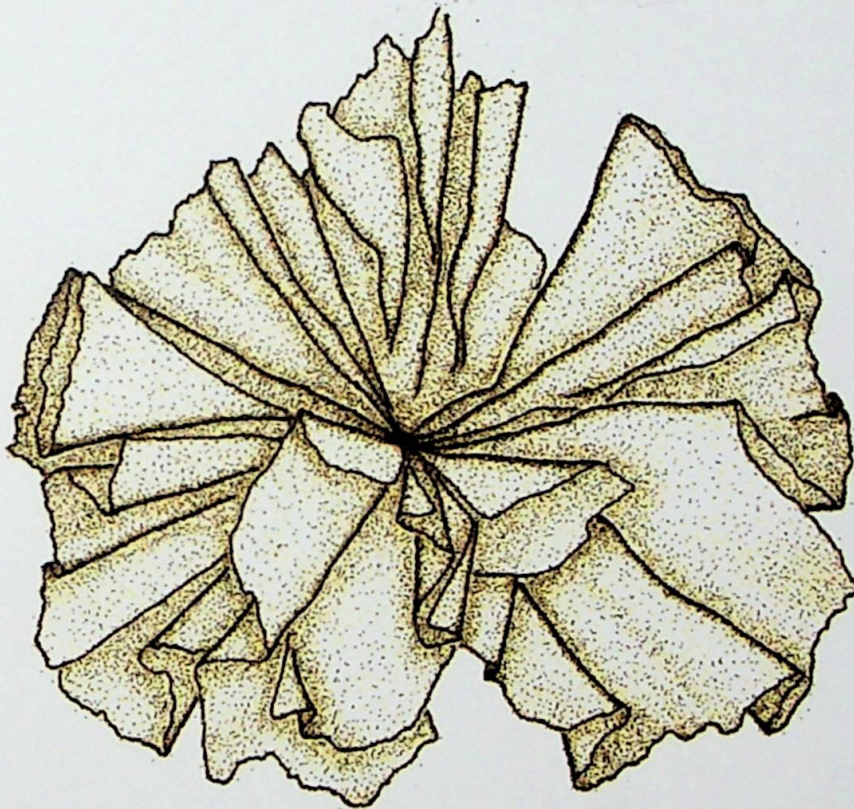


Daniela Milstein



DIVERSIDADE MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE *PORPHYRA* DO BRASIL

Handwritten signature and initials in blue ink, located to the right of the title.



São Paulo
2006

Daniela Milstein

Diversidade molecular das espécies de *Porphyra* do Brasil

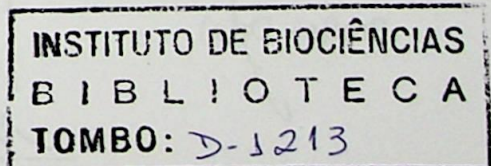
Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientador(a): Profa. Dra. Mariana C.
Oliveira

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Sergio S.
Matioli

São Paulo

2006



Defesa: 28.07.06

Milstein, Daniela

Diversidade molecular das espécies de
Porphyra do Brasil. 120 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento de
Botânica.

1. *Porphyra* 2. Filogenia Molecular 3.
Introns do grupo I
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

O Senhor é meu pastor, nada me faltará. Far-me-á repousar em pastos verdejantes, me conduzirá sobre águas plácidas. Minha alma será restaurada, Ele guiar-me-á nas veredas da justiça por Seu Nome. Se tiver que seguir pelo sombrio vale da morte, não temerei nenhum mal, pois Tu estás comigo. Teu poder e Teu apoio, eles me consolarão. Tu prepararás para mim uma mesa diante de meus inimigos; ungiste a minha cabeça com óleo, meu cálice transborda de fartura. Somente bondade e misericórdia me seguirão em todos os dias de minha vida, e habitarei na Casa do Senhor por longos anos.

Salmo de David

Livro: 1-23

Agradecimentos

À Dra. Mariana C. Oliveira pela orientação, pelo carinho, pela dedicação, pela paciência, pela eficiente e honesta transmissão de suas sabedorias e principalmente por ter me aberto as portas para ingressar na vida acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (02/05875-0) pela bolsa de doutorado e aos assessores pelas sugestões ao longo do trabalho.

Ao Dr. Sergio R. Matioli pela co-orientação, pelas sugestões e pelo auxílio durante diferentes etapas do projeto.

À querida Silvia R. Blanco e ao querido Rosário Petti por todo o apoio técnico, pela disponibilidade, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Eurico C. Oliveira pelas coletas, dicas, sabedoria e pela revisão do manuscrito.

Às Dra. Estela e Dra. Fungi, aos Dr. Flávio e Dr. Edison (*In memoriam*).

Às Dra. Mutue T. Fujii, Dra. Nair S. Yokoya e Dra. Silvia P. Guimarães (Instituto de Botânica, Projeto Flora Ficológica do Estado de São Paulo 1998/04955-3) pelo auxílio, pela amizade e pelos bons momentos durante as diferentes coletas.

Às queridas meninas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Dra. Ana Paula, Dra. Hana, Dra. Regina, Marisa, Myna e Érica pela disponibilidade e pelos diferentes ensinamentos.

Aos meus queridos amigos de bancada, Aléxis, Amanda, Bia, Cíntias, Cristalina, Cristian, Dani, Didi (Botânico), Guilherme, José, Lagosta, Lígia, Leila, Lu, Mariane, Mônica, Nat, Rose, Suzana e Vivi.

À minha querida amiga Leila pelo suporte, carinho e pelo sorriso sempre estampado no rosto.

Ao José, pela colaboração em todos os tipos de atividades.

Ao Tio Noah pelo apoio na escolha do meu caminho e pelo incentivo

Aos Milsteins, David, Esther, Larissa, Suzane e Bisker pela paciência, incentivo, apoio e carinho e auxílio em diversas atividades.

À Zilda pela paciência e pela manutenção da infra-estrutura.

Ao meu pai, pelo auxílio imprescindível no fechamento da tese.

Índice

Capítulo 1.	Introdução Geral	01
Capítulo 2.	Filogenia molecular de Bangiales (Rhodophyta) baseada no seqüenciamento do gene nuclear SSU Rdna: Ênfase nas espécies de <i>Porphyra</i> no Brasil	22
Capítulo 3.	Caracterização de itrons do grupo I em diferentes populações de <i>Porphyra spiralis</i> var. <i>amplifolia</i> (Bangiales, Rhodophyta) das costas sul e sudeste do Brasil	51
Capítulo 4.	Caracterização de marcadores genéticos para populações de <i>Porphyra spiralis</i> var. <i>amplifolia</i> (Bangiales, Rhodophyta) das costas sul e sudeste do Brasil	93
Capítulo 5.	Considerações finais	116

Lista de Abreviaturas

cDNA – DNA complementar

cox2 - gene que codificam a subunidade 2 da enzima citocromo oxidase

cox3 - gene que codificam a subunidade 3 da enzima citocromo oxidase

HE - endonuclease de “homing”

HEG- gene que codifica a endonuclease de “homing”

IGS - seqüência interna guia

ITS - Espaçador interno transcrito

LSU rDNA - gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade GRANDE do ribossomo

MP- Máxima Parcimônia

mRNA – RNA mensageiro

MV – Máxima Verossimilhança

NJ – “neighbor joining”

Nt - nucleotídeo

ORF - quadro aberto de leitura

Pb – Pares de bases

PSA - *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*

RAPD - análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso

rbcL - gene que codifica a subunidade grande da enzima ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase-oxigenase

rbcS - gene que codifica a subunidade pequena da enzima ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase-oxigenase

rDNA – gene que codifica o RNA ribossômico

RFLP - análise de fragmentos de restrição de tamanhos polimórfico

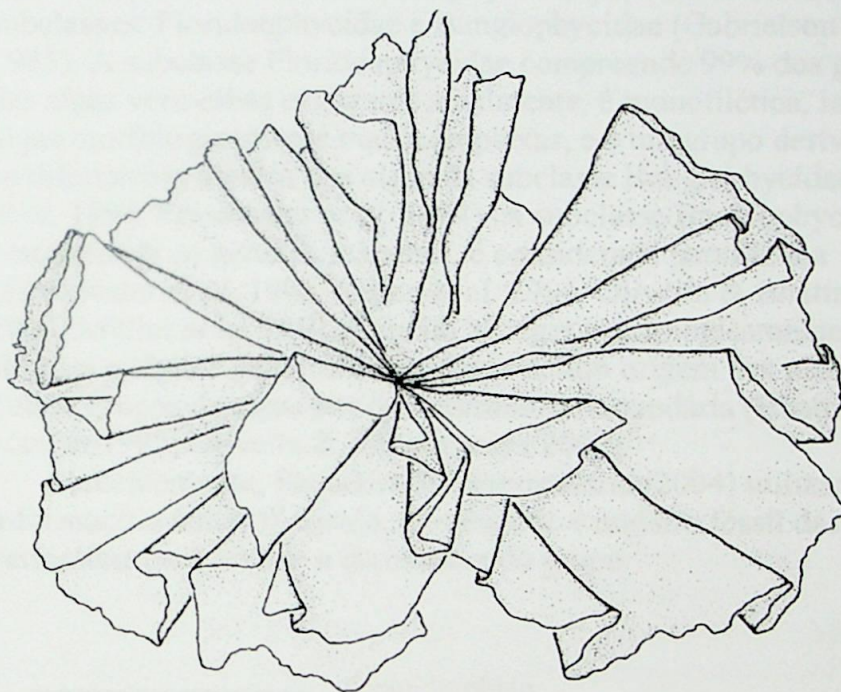
rRNA – RNA ribossômico

Rubisco - enzima ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase-oxigenase

SSU rDNA - gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade pequena do ribossomo

tRNA– RNA transportador

Capítulo 1



Introdução Geral

Introdução

As algas vermelhas, filo Rhodophyta, são tradicionalmente classificadas numa classe Rhodophyceae, que é dividida em duas subclasses: Florideophycidae e Bangiophycidae (Gabrielson *et al.* 1985). A subclasse Florideophycidae compreende 99% dos gêneros das algas vermelhas existentes atualmente, é monofilética, inclui as algas morfologicamente mais complexas, e é um grupo derivado que se diferenciou a partir das algas da subclasse Bangiophycidae (Ragan *et al.* 1994, Freshwater *et al.* 1994). A subclasse Bangiophycidae compreende os gêneros restantes, é considerada parafilética (Freshwater *et al.* 1994, Ragan *et al.* 1994, Oliveira & Bhattacharya 2000, Müller *et al.* 2001b), inclui as algas morfologicamente mais simples e alguns gêneros desse grupo deram origem aos plastos de outros grupos de algas por endossimbiose secundária (Bhattacharya & Medlin 1995, Oliveira & Bhattacharya 2000).

Recentemente, Saunders & Hommersand (2004) utilizaram informações sobre filogenia, diversidade e registro fóssil das algas vermelhas para revisar a taxonomia do grupo.

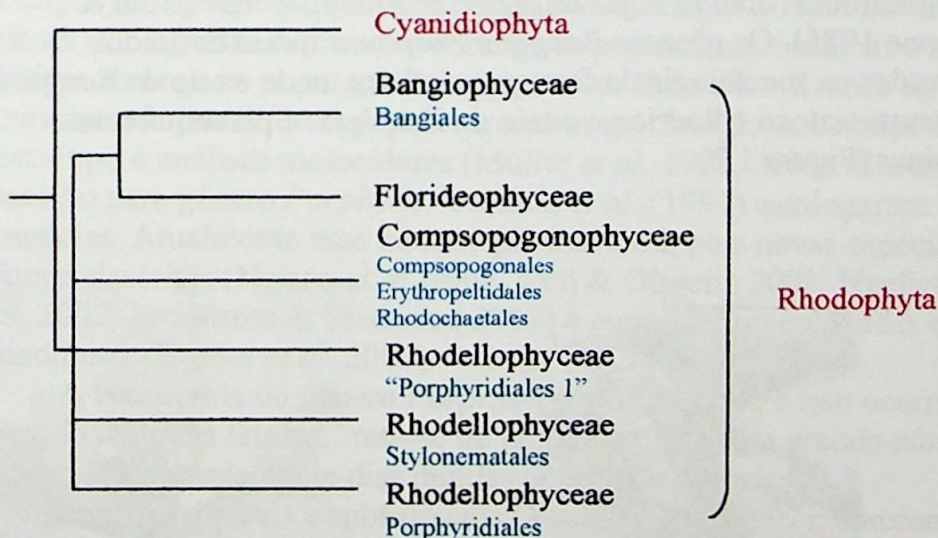


Fig.1.1. Representação esquemática da nova classificação para Rhodophyta proposta por Saunders & Hommersand (2004).

Assim, propuseram a divisão do grupo nos filós Cyanidiophyta e Rhodophyta, sendo a última subdividida nos subfilós Rhodellophytina (classe Rhodellophyceae), Metarhodophytina (classe Compsopogonophyceae) e Eurhodophytina, sendo que este último inclui as classes Bangiophyceae e Florideophyceae. A nova classe Bangiophyceae inclui apenas a ordem Bangiales (Fig 1.1). Neste trabalho, será adotada a nova classificação proposta por Saunders & Hommersand (2004).

A ordem Bangiales forma um agrupamento monofilético (Ragan *et al.* 1994, Oliveira *et al.* 1995, Oliveira & Bhattacharya 2000, Müller *et al.* 2001b) que inclui os gêneros *Bangia* Lyngbye (Lyngbye 1819) e *Porphyra* C. Agardh (Agardh 1824). Recentemente, três novos gêneros filamentosos foram estabelecidos para a ordem: *Pseudobangia kaycoleia* K. M. Müller & Sheath (Müller *et al.* 2005), *Dione arcuata* W.A. Nelson e *Minerva aenigmata* W.A. Nelson (Nelson *et al.* 2005).

Os gêneros da ordem Bangiales apresentam um histórico de vida heteromórfico e bifásico, no qual a fase gametofítica (n) é macroscópica e transitória e a fase esporofítica (2n) é filamentososa e perene. Possuem conexões citoplasmáticas entre as células (“pit connections”) na fase esporofítica, característica também compartilhada com as algas da classe Florideophyceae (Bold & Wynne 1985). Os gêneros *Bangia* e *Porphyra* foram definidos baseados na morfologia da fase gametofítica, onde o talo de *Bangia* é parenquimatoso cilíndrico e o talo de *Porphyra* é parenquimatoso laminar (Figura 1.2).

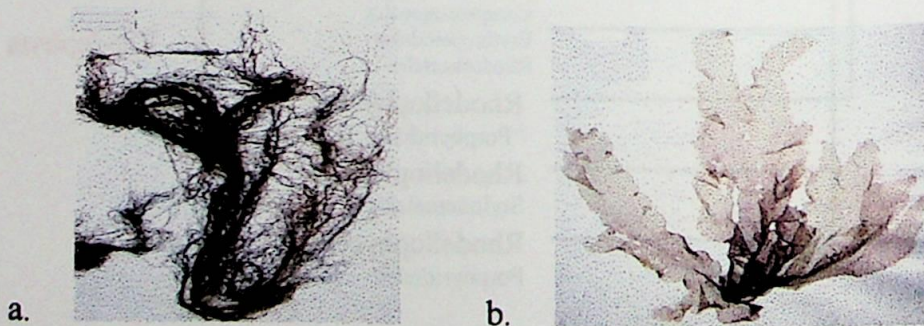


Figura 1.2. Talo gametofítico de: a – *Bangia atropurpurea*, b – *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*

A fase esporofítica, também chamada de conchocelis (Fig 1.3), é constituída de filamentos microscópicos que vivem endoliticamente em conchas calcárias de bivalves (Bold & Wynne 1985).



Figura 1.3. Cultura *in vitro* de *Porphyra* sp. na fase conchocelis. Foto: Tracy Farr (www.niwascience.co.nz)

O gênero *Bangia* ocorre em ambiente marinho na região entre-marés e também em ambiente de água doce (Sheath & Cole 1984, Müller *et al.* 1998). O gênero *Porphyra* ocorre em ambiente marinho e estuarino na região entre-marés, e também pode ser encontrado no sub-litoral (Bold & Wynne 1985, Miura 1998).

Tradicionalmente, o gênero *Bangia* é separado em duas espécies: *Bangia fuscopurpurea* (Dillwyn) Lyngbye e *Bangia atropurpurea* (Roth) C. Agardh. A primeira abrange as populações marinhas e a última abrange as populações de água doce. Essa classificação foi corroborada por diferenças nos caracteres morfológicos, estudos de cariótipo e análises moleculares (Müller *et al.* 1998, 2003). Em uma revisão para gênero *Porphyra*, Yoshida *et al.* (1997) catalogaram 133 espécies. Atualmente esse número já se alterou, pois novas espécies foram descritas (Nelson *et al.* 2001, Coll & Oliveira 2001, Neefus *et al.* 2002, Lindstrom & Fredericq 2003) e outras foram colocadas em sinonímia (Broom *et al.* 2002).

A taxonomia do gênero *Porphyra* é problemática e isso ocorre devido a alguns fatores: trata-se de um gênero com um grande número de espécies amplamente distribuídas ocorrendo em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (Yoshida *et al.* 1997); apresenta uma morfologia simples com poucos caracteres para a discriminação de espécies; algumas espécies podem apresentar plasticidade

fenotípica de acordo com fatores ambientais e algumas espécies podem ser crípticas (Stiller & Waaland 1993). Outro problema é a sua relação com o gênero *Bangia*. Stiller & Waaland (1993) levantaram a hipótese de *Bangia* e *Porphyra* não serem gêneros monofiléticos, o que foi corroborado posteriormente com análises moleculares (Oliveira 1993, Oliveira *et al.* 1995, Müller *et al.* 1998, Oliveira & Bhattacharya 2000, Müller *et al.* 2001a, Milstein 2002 & capítulo 2).

Além disso, o registro fóssil dos dois gêneros é muito antigo. Foram reportados fósseis datando de 425 milhões de anos semelhantes à fase conchocelis de *Porphyra* (Campbell 1980), e fósseis datando aproximadamente de 570 milhões de anos de talo foliáceo, com células cruciadas em tetrade, indistinguíveis de um carposporângio de um talo de *Porphyra* atual (Xiao *et al.* 1998). Foi descrito também, um fóssil datando entre 750 a 1.250 bilhões de anos, muito semelhante a gametófitos de *Bangia* com células rizoidais similares às de *Porphyra* (Butterfield *et al.* 1990). Com uma longa história evolutiva e uma morfologia simples, a convergência evolutiva das características morfológicas das espécies de *Porphyra* pode mascarar uma grande divergência genética (Stiller & Waaland 1993).

Algumas espécies do gênero *Porphyra*, conhecidas pelo nome japonês “nori”, são cultivadas em redes no mar, processadas e vendidas como alimento humano (Mumford & Miura 1988). A indústria de aquicultura de “nori” na Ásia fatura anualmente 1.2 bilhões de dólares (FAO 2003). Nos últimos 50 anos, a produção de *Porphyra* aumentou consideravelmente devido ao desenvolvimento de sistemas de redes de fibra sintética flutuante, e a habilidade de semear as redes com esporos de conchocelis selecionadas, cultivadas em meio de cultura (Miura & Aruga 1987).

A imprecisão na taxonomia do grupo pode causar sérias implicações em relação ao cultivo de *Porphyra*. É importante que estas algas sejam identificadas corretamente, pois cada uma delas apresenta características diferentes tanto durante o crescimento, como após ser processada em “nori” para o consumo humano (Noda & Iwata 1983).

O gênero *Porphyra* ocorre em vários pontos da costa litorânea do Brasil, sendo mais comum nas regiões Sul e Sudeste (Oliveira 1977). Oliveira & Coll (1975) fizeram uma revisão taxonômica do gênero para o litoral brasileiro, e descreveram duas espécies de *Porphyra* com duas variedades cada: *Porphyra acanthophora* Oliveira & Coll var.

acanthophora e *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* Oliveira & Coll; *Porphyra spiralis* Oliveira & Coll var. *spiralis* e *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Oliveira & Coll. As espécies *Porphyra vulgaris* C. Agardh, *Porphyra laciniata* (Lightfoot) C. Agardh var. *umbilicata* C. Agardh, *Porphyra roseana* Howe e *Porphyra atropurpurea* (Olivi) De Toni haviam sido descritas para a costa brasileira, porém nunca mais foram encontradas na região. Portanto, Oliveira & Coll (1975) consideraram incerta a sua ocorrência no Brasil.

Porphyra leucosticta Thuret in Le Jolis, *Porphyra pujalsii* Coll & Oliveira e *Porphyra rizzinii* Coll & Oliveira, descritas por Coll & Oliveira (1976) para o Uruguai, foram encontradas posteriormente no litoral brasileiro, ocorrendo nas águas frias de ressurgência de Cabo Frio, Rio de Janeiro (Yoneshigue 1985). *Porphyra drewiana* Coll & Oliveira foi descrita por Coll & Oliveira (2001) ocorrendo na costa sudeste do Brasil.

Marcadores Moleculares

Devido aos poucos caracteres morfológicos, reprodutivos e ecológicos disponíveis para análises filogenéticas da ordem Bangiales, técnicas de biologia molecular vêm sendo amplamente utilizadas e diferentes marcadores moleculares vêm sendo testados. Análise de isozimas, análise de fragmentos de restrição de tamanhos polimórficos (“restriction fragment length polymorphisms” – RFLP), e análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso (“random amplified polymorphic DNA” – RAPD) entre outras técnicas, tem sido empregadas desde a última década, em uma tentativa de esclarecer a diversidade genética, identificação de espécies e filogenia dentro da ordem Bangiales. Como o seqüenciamento de DNA teve seu custo reduzido e tornou-se uma técnica de rotina nos laboratórios, é atualmente um dos métodos mais usados para esses tipos de análises.

O gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade pequena do ribossomo (“small subunit rRNA gene” - SSU rDNA), conhecido também como 18S, é um marcador molecular bastante utilizado para análises filogenéticas. A estrutura secundária conservada do gene auxilia no alinhamento das seqüências de diferentes organismos; as regiões conservadas e semi-conservadas são utilizadas como sítios informativos em análises filogenéticas de alta hierarquia taxonômica;

e as regiões variáveis auxiliam na identificação de diferentes espécies dentro da ordem Bangiales (Oliveira *et al.* 1995, Müller *et al.* 1998, 2003, Broom *et al.* 1999, Kunimoto *et al.* 1999a, Nelson *et al.* 2001, Klein *et al.* 2003, Milstein 2002, Klein *et al.* 2003). Os genes que codificam os rRNA (SSU, 5.8S e “large subunit” - LSU) ocorrem nos eucariotos em unidades de transcrição, que são repetidas em “tandem” (Fig. 1.4), separadas por espaçadores que podem ser transcritos (“external transcribed spacer” – ETS) ou não (“Intergenic spacer”- IGS).

Os genes que codificam os rRNA, por sua vez, são separados pelos espaçadores internos transcritos (“internal transcribed spacers” - ITS-1 e ITS-2) que após a transcrição são excisados do rRNA maduro. Devido a menor pressão seletiva (região não codificante), os ITSs evoluem mais rápido do que os genes que os flanqueiam e são freqüentemente utilizados em Bangiales para comparação intra-específica (Kunimoto *et al.* 1999b, 2003) e para o reconhecimento de espécies (Broom *et al.* 2002, Niwa *et al.* 2005).

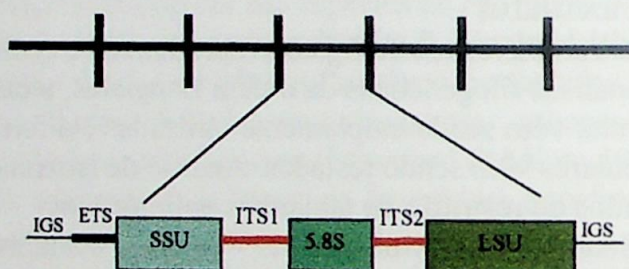


Figura 1.4. Esquema do arranjo ribossômico em “tandem” (não está em escala de tamanho). IGS- espaçador intergênico; ETS- espaçador externo transcrito; ITS- espaçador interno transcrito; SSU- SSU rDNA; 5.8S- 5.8S rDNA; LSU- LSU rDNA.

Diversos isolados de *Bangia* e *Porphyra* apresentam introns do grupo I (detalhes no próximo item) inseridos no gene nuclear SSU rDNA (Stiller & Waaland 1993, Oliveira & Ragan 1994, Oliveira *et al.* 1995, Müller *et al.* 1998, 2001a, Kunimoto *et al.* 1999a, Broom *et al.* 2002, Milstein 2002). Como os introns do grupo I apresentam um núcleo catalítico com algumas seqüências conservadas (isto é, possíveis de serem alinhadas entre si), foram utilizados como marcadores moleculares para análises filogenéticas de *Bangia* e *Porphyra* (Müller *et al.* 2001a), para discriminação de espécies de *Porphyra* (Broom *et al.* 2002, Milstein 2002), e para identificação de

linhagens de *Porphyra* (Oliveira & Ragan 1994, Kunimoto *et al.* 1999b, Kunimoto *et al.* 2003).

Enquanto que nas algas verdes e plantas terrestres o gene que codifica a subunidade grande (*rbcL*) da enzima ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) está localizado no cloroplasto e o gene que codifica a subunidade pequena (*rbcS*) da enzima Rubisco está localizado no núcleo, nas algas vermelhas e nas algas pardas ambos os genes (*rbcL* e *rbcS*) estão no cloroplasto (Fujiwara *et al.* 1993, Bhattacharya & Medlin 1995). Os dois genes são separados por uma pequena região espaçadora (espaçador *rbcL-S*), que é empregada em análises de isolados de diferentes regiões biogeográficas e em reconstruções filogenéticas entre e dentro de espécies de algas, devido a alta variabilidade nessa região (Maggs *et al.* 1992, Goff *et al.* 1994, Zuccarello & West 1997). Na ordem Bangiales, o gene *rbcL* e o espaçador *rbcL-S* têm sido utilizados para filogenia, identificação de espécies e biogeografia (Müller *et al.* 1998, Neefus *et al.* 2000, Teasdale *et al.* 2000, Teasdale *et al.* 2002, Klein *et al.* 2003, Lindstrom & Fredericq 2003, Niwa *et al.* 2005).

Em estudos populacionais de animais, os marcadores mitocondriais como, por exemplo, a região controle da mitocôndria, é bastante utilizada (Awise 1994). No entanto, a taxa de variação do DNA mitocondrial em Rhodophyta é pouco conhecida no nível populacional (Zuccarello *et al.* 1999). Baseados em dados do genoma mitocondrial de algumas algas vermelhas, Zuccarello *et al.* (1999) propuseram a utilização do espaçador dos genes que codificam a subunidade 2 (*cox2*) e 3 (*cox3*) da enzima citocromo oxidase como marcador mitocondrial para populações de Rhodophyta. O espaçador *cox2-3* tem sido utilizado e reproduzido com sucesso em análises populacionais de diferentes espécies de Rhodophyta (Marston & Bohnsack 2002, Zuccarello & West 2002, Chiasson *et al.* 2003, Cohen *et al.* 2004).

Introns

Muitos genes eucarióticos são interrompidos por seqüências de DNA conhecidas como introns. A transcrição desses genes interrompidos gera um pré-RNA que inclui o intron e os exons flanqueadores (seqüências codificantes no RNA maduro). A excisão (remoção) dos introns e a ligação dos exons ocorrem por um processo conhecido

como RNA “splicing” ou processamento do intron. Os introns têm que ser removidos do pré-RNA de forma precisa, de modo a não prejudicar a tradução do gene na proteína correspondente (Fig. 1.5). Os introns foram descritos em 1977 por Richard J. Roberts e Philip A. Sharp, que receberam o prêmio Nobel em 1993 por essa descoberta.

Os introns foram classificados em quatro grupos principais, de acordo com suas características estruturais e seus mecanismos de remoção do pré-RNA. São eles: introns do grupo I, introns do grupo II, introns de RNA mensageiro (mRNA) nuclear e introns de RNA transportador (tRNA) nuclear (Cech 1988). Introns do grupo I são amplamente distribuídos em protistas, bactérias e bacteriófagos. Introns do grupo II são encontrados em mitocôndrias de fungos e plantas terrestres, plastídio de algas, bactérias e Archaea. Introns de mRNA são as inserções mais comuns encontradas em genes nucleares de eucariotos. Introns de tRNA são encontrados em tRNA nuclear de eucariotos e em tRNA, rRNA e mRNA em Archaea (Haugen *et al.* 2005).

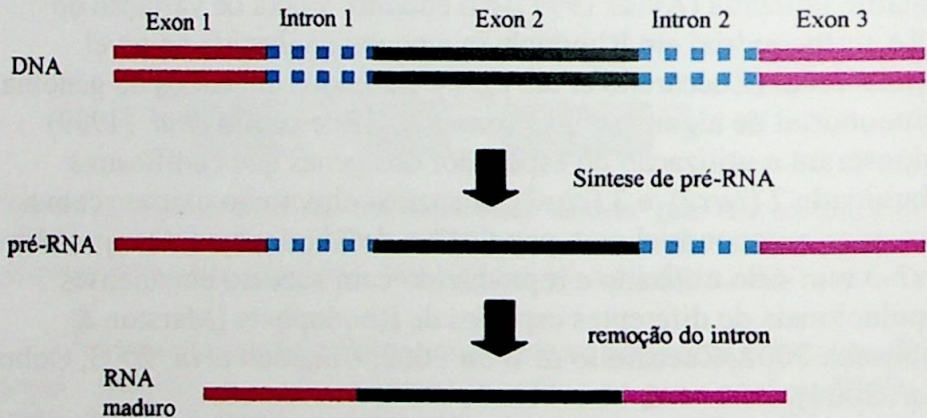


Figura 1.5. Transcrição dos genes com introns: remoção dos introns e ligação dos exons. Modificado de Lewin (2000).

Introns do Grupo I

Os introns do grupo I pertencem a uma linhagem de RNA conhecida por ribozima. Ribozima é o termo utilizado para designar moléculas de RNA que possuem atividades catalíticas. Os introns do grupo I são elementos genéticos autônomos que catalisam a sua própria remoção (“self-splicing” ou auto-processamento) do pré-RNA, através de duas reações de transesterificação consecutivas (trocas de ligações fosfodiéster), em presença de uma guanosina (G) livre, resultando na excisão do intron e na ligação dos exons (Cech & Bass 1986; Cech 1988, 1990). Após ser excisado do pré-RNA, uma terceira reação de transesterificação pode ocorrer, levando a circularização do intron livre (Zaug *et al.* 1983). O intron livre também pode se incorporar em moléculas de RNA sem intron, através de duas reações de transesterificação consecutivas pelo mecanismo de “reverse splicing” ou processamento reverso (Woodson & Cech 1989). A atividade catalítica do intron está diretamente relacionada com a sua estrutura tridimensional (Golden *et al.* 1998). Na Figura 1.6 está demonstrado um esquema dos dois mecanismos.

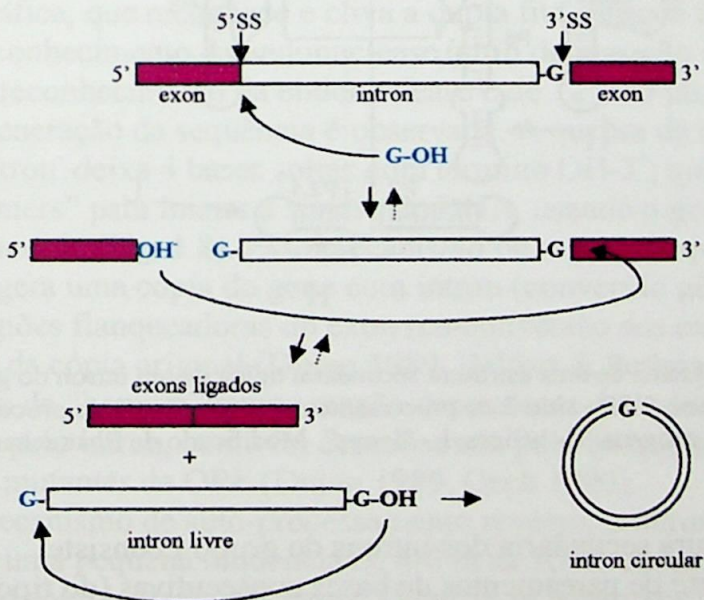


Figura 1. 6. Esquema dos mecanismos de auto processamento (↓) e auto-processamento reverso (↑) dos introns do grupo I. 5'SS- sítio 5' de processamento; 3'SS- sítio 3' de processamento; G-OH destacado em azul - guanosina livre. Modificado de Haugen *et al.* (2005).

Apesar das seqüências dos introns do grupo I serem bastante variáveis, todas elas dobram-se em uma estrutura secundária e terciária característica, composta de nove elementos pareados (hélices P1-P9) que são conservados dentro do grupo (Fig. 1.7). No centro da estrutura secundária está localizado um núcleo catalítico com elementos estruturais e seqüências de nucleotídeos conservados, que é responsável pelas atividades catalíticas dos introns (Michel *et al.* 1982, Cech 1990).

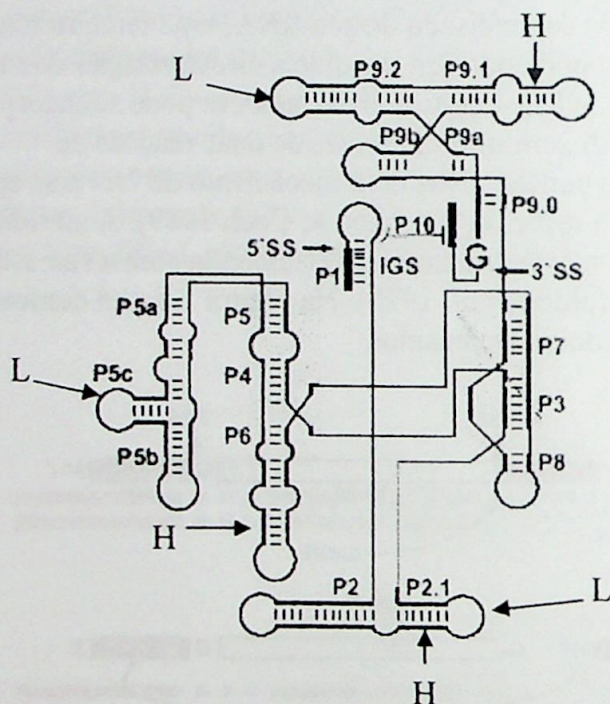


Figura 1.7. Esquema de uma estrutura secundária típica de um intron do grupo IC1. P1 a P10 - hélices; 5'SS - sítio 5' de processamento; 3'SS - sítio 3' de processamento; G - Guanosina exógena; H- hélices; L- "loops". Modificado de Bhattacharya *et al.* (2005).

A estrutura secundária dos introns do grupo I consiste principalmente de pareamentos de bases consecutivas (do tipo Watson-Crick), gerando duplas hélices pequenas, porém estáveis (Michel & Westhof 1990). Diferenças nas seqüências dos introns alteram a estrutura secundária (geralmente nas regiões periféricas ao núcleo catalítico), o que classifica os introns do grupo I em subgrupos

(IA, IB, IC, ID e IE) que ainda podem ser subdivididos (por ex. IC1-IC3). A estrutura secundária típica do intron do subgrupo IC1 contém dez domínios (hélices P1-P10) conservados (Michel & Westhof 1990, Suh *et al.* 1999), sendo o subgrupo mais comum na natureza (Haugen *et al.* 2004b). Análises filogenéticas demonstraram que os introns do grupo I que ocorrem na mesma posição em um mesmo gene de qualquer organismo são proximamente relacionados (Hibbett 1996, Suh *et al.* 1999, Müller *et al.* 2001a, Nikoh & Fukatsu 2001, Bhattacharya *et al.* 2005), e é suposto que tenham um único ancestral comum (Cech 1988).

Nas regiões periféricas ao núcleo catalítico, formam-se “loops” ou laços (regiões onde não ocorrem pareamentos), que podem incluir quadros abertos de leitura (“open reading frames – ORF”), que expressam proteínas relacionadas à mobilidade do intron (Cech 1988).

Por mobilidade do intron, entendem-se dois diferentes processos: Intron “homing” e auto-processamento reverso. Para que o “homing” ocorra são necessárias duas formas de um dado gene, um com intron (intron⁺) e um sem intron (intron⁻), e a possibilidade de troca genética entre eles. O intron do gene intron⁺ codifica uma endonuclease DNA-sítio-específica, que reconhece e cliva a dupla fita do gene intron⁻ no sítio de reconhecimento da endonuclease (sítio de inserção do intron). O sítio de reconhecimento da endonuclease é de 12 a 40 pb, onde pouca degeneração da seqüência é observada. A quebra da dupla fita do gene intron⁻ deixa 4 bases soltas com término OH-3', que atuam como “primers” para iniciar a síntese do DNA, usando o gene intron⁺ como fita molde (Fig. 1.8). Esse mecanismo de reparo de quebra da dupla fita gera uma cópia do gene com intron (conversão gênica) e com as regiões flanqueadoras do exon (co-conversão dos exons) sem a destruição da cópia original (Dujon 1989, Belfort & Perlman 1995). O mecanismo de “homing” é uma reação dependente da endonuclease codificada pelo intron, como foi demonstrado pelo bloqueio da reação através de mutantes da ORF (Dujon 1989, Cech 1990).

No mecanismo de auto-processamento reverso, o intron livre reconhece uma pequena seqüência de 4-6 nt no RNA intron⁻ por pareamento complementar de bases. O intron se insere por auto-processamento reverso no RNA intron⁻ (mecanismo similar ao do auto-processamento, Fig. 1.5) que é transcrito reversamente em cDNA intron⁺. Após sofrer recombinação com o gene intron⁻, o cDNA intron⁺ converte o gene intron⁻ em intron⁺. Esse processo é

independente da atividade da endonuclease e pode ocorrer tanto em sítios homólogos como em sítios heterólogos (transposição) que contenham seqüências homólogas as do sítio de reconhecimento do intron (Woodson & Cech 1989, Belfort & Perlman 1995).

A transferência lateral do intron pode ocorrer via auto-processamento reverso ou “homing” (Woodson & Cech 1989), sendo o primeiro processo mais provável (Belfort & Perlman 1995, Bhattacharya *et al.* 2005), devido a alta especificidade da endonuclease requerida para o “homing” (Woodson & Cech 1989).

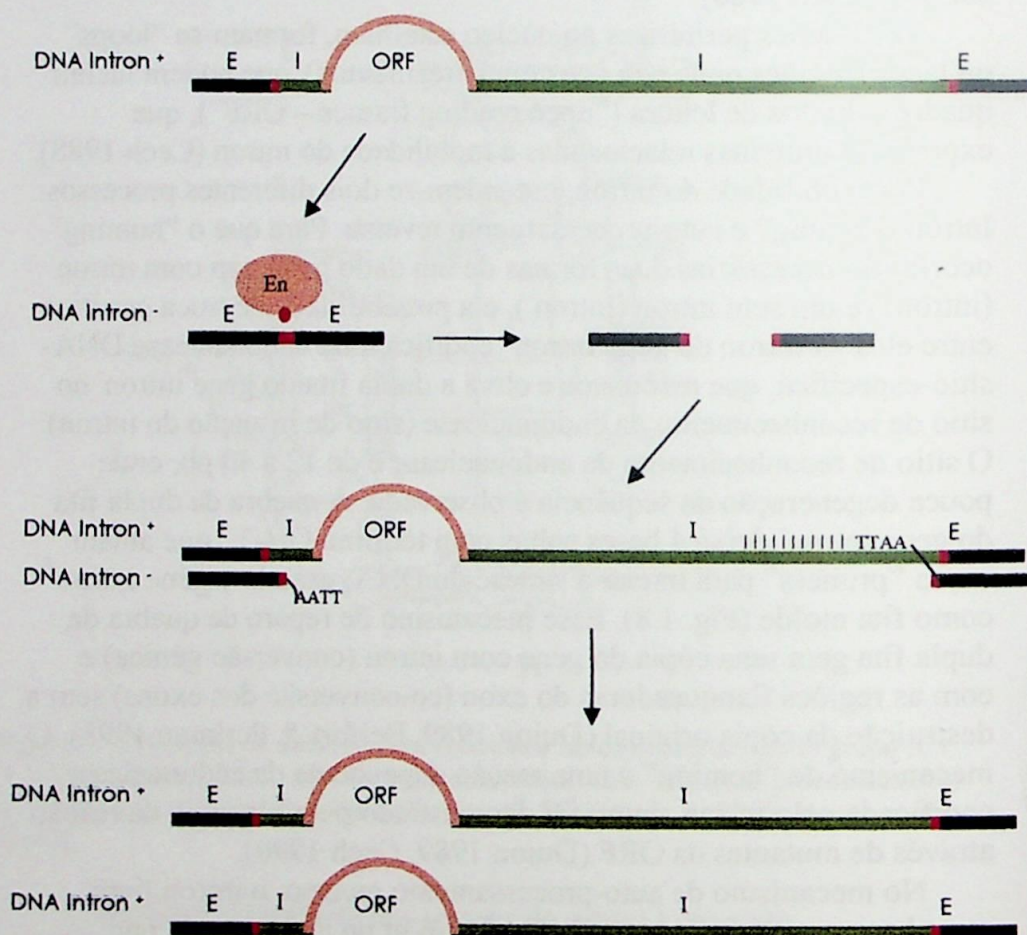


Figura 1.8. Mecanismo de “homing” dos introns do grupo I. E-exon, I-intron, ORF-“open reading frame”, En - endonuclease, traço vermelho- sítio alvo da endonuclease.

Introns do Grupo I na ordem Bangiales

Os primeiros introns do grupo I descritos para os genes que codificam o rRNA foram encontrados no LSU rDNA (gene que codifica o rRNA da subunidade grande do ribossomo) nuclear dos protistas *Tetrahymena thermophila* (Wild & Gall 1979) e *Physarum polycephalum* (Muscarella & Vogt 1989) e no SSU rDNA nuclear do Ascomycota *Pneumocystis carinii* (Sogin & Edman 1989).

Atualmente, mais de 1400 introns do grupo I (Haugen *et al.* 2005) foram reportados em: genes de mitocôndrias, de cloroplastos, vírus e eubactérias (Lambowitz & Belfort 1993), no gene nuclear que codifica o rRNA de eucariotos como fungos (De Wachter *et al.* 1992; Haugen *et al.* 2004a), amebas filosas (Bhattacharya & Oliveira 2000), algas verdes (Bhattacharya *et al.* 1994, 1996, Booton *et al.* 2004) e algas pardas (Bhattacharya *et al.* 2001). Para algas vermelhas, foi descrita ocorrência de introns do grupo I no SSU rDNA de *Hildenbrandia rubra* (classe Florideophyceae, ordem Hildenbrandiales) por Ragan *et al.* (1993), no SSU rDNA de *Bangiopsis* sp. (classe Rhodellophyceae, ordem Stylothematales, ver capítulo 2) e para algumas espécies de *Bangia* e *Porphyra* (classe Bangiophyceae, ordem Bangiales).

A nomenclatura dos introns utilizada nesse trabalho é uma adaptação da nomenclatura proposta por Johansen & Haugen (2001) para introns do grupo I em rDNA. A letra que antecede o número do intron se refere à primeira letra do gene ao qual o intron está inserido, e o número se refere ao sítio de inserção do intron de acordo com a numeração para a seqüência de SSU rDNA em *Escherichia coli*.

As primeiras descrições de introns no SSU rDNA de *Porphyra* foram feitas por Stiller & Waaland (1993) e Oliveira & Ragan (1994). Stiller & Waaland (1993) detectaram por RFLP, grandes inserções no SSU rDNA de algumas espécies de *Porphyra*. Oliveira & Ragan (1994) seqüenciaram o gene SSU rDNA de espécies de *Porphyra* e reportaram a ocorrência de um intron do grupo I inserido próximo à extremidade 3' do gene (S1506, posição referência em *E. coli*, 1506), a mesma descrita para *Hildenbrandia rubra* (Ragan *et al.* 1993).

A partir daí, a ocorrência de introns do grupo I em isolados de *Bangia* e *Porphyra* começou a ser descrita em diversos trabalhos envolvendo filogenias moleculares e identificação de espécies. Müller *et al.* (1998) reportaram introns do grupo I no SSU rDNA de algumas populações de *Bangia*, inseridos no começo do gene próximo à

extremidade 5' (posição referência em *E. coli*, 516). Posteriormente, foram reportados três tipos diferentes de ocorrência de introns no SSU rDNA de *Bangia* e *Porphyra*: alguns isolados apresentavam somente o intron S516, alguns isolados apresentavam apenas o intron S1506, e o terceiro tipo apresentava os dois introns (S516 e S1506) inseridos no SSU rDNA (Müller *et al.* 2001a).

Alguns introns do grupo I descritos para *Bangia* e *Porphyra* apresentam distribuição esporádica no SSU rDNA, isto é, isolados de uma mesma espécie, com seqüências idênticas de SSU rDNA podem ou não apresentar os introns. *Porphyra spiralis* var. *spiralis* coletada em Vila Velha, Espírito Santo não apresentou intron no SSU rDNA (Milstein 2002), embora já tivesse sido reportada a presença de introns S1506 em isolados coletados em Ubatuba, São Paulo (Oliveira & Ragan 1994) e em Peruíbe, São Paulo (Bhattacharya & Oliveira 2000). A distribuição esporádica dos introns no SSU rDNA para outras espécies de *Porphyra* foi também observado por Kunitomo *et al.* (1999a) e Broom *et al.* (2002), e para *Bangia* por Müller *et al.* (2001a).

A similaridade entre as filogenias dos introns S516 e S1506 de *Bangia* e *Porphyra* e seus respectivos SSU rDNA, sugere que estes introns estiveram imóveis durante a evolução da ordem Bangiales. Após terem sido adquiridos por um ancestral de *Bangia* e *Porphyra* (por transferência lateral), os introns S516 e S1506 foram transmitidos verticalmente e em alguns casos foram perdidos (Müller *et al.* 2001a).

Objetivos Gerais

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Seqüenciar o SSU rDNA de espécies de *Porphyra* do Atlântico Sul, com o intuito de complementar a filogenia do grupo para as espécies que ocorrem no Brasil.
2. Verificar a dinâmica do intron a partir de sua distribuição em populações de uma mesma espécie, e examinar suas características estruturais.
3. Estudar o mecanismo de excisão do transcrito primário dos diferentes polimorfismos de tamanho do intron.
4. Delimitar algumas populações de *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* que ocorrem no litoral sul e sudeste do Brasil, utilizando o

intron 1506 que ocorre no SSU rDNA desta espécie como marcador populacional. Seqüenciar nas populações analisadas, outras regiões variáveis como o espaçador *rbcL-S* e o espaçador *cox2-3*.

Referências Bibliográficas

- Awise J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York, 511 pp.
- Bhattacharya, D. & Medlin 1995. The phylogeny of plastids: A review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *Journal of Phycology*. 33: 134-137.
- Bhattacharya, D. & Oliveira, M.C. 2000. The SSU rDNA coding region of a filose amoeba contains a group I intron lacking the universally conserved G at the 3'-terminus. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(6): 585-589.
- Bhattacharya, D., Surek, B., Rüsing, M., Damberger, S. & Melkonian, M. 1994. Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear encoded rRNA of Zygnematales. *PNAS. USA*. 91: 9916-9920.
- Bhattacharya, D., Friedl, T. & Damberger, S. 1996. Nuclear-encoded rDNA group I intron: Origin and Phylogenetic relationship of insertion site lineages in the green algae. *Mol. Biol. Evol.* 13(7): 978-989.
- Bhattacharya D., Cannone J.J. & Gutell R.R. 2001. Group I intron lateral transfer between red and brown algal ribosomal RNA. *Current Genetics* 40: 82-90.
- Bhattacharya d., Reeb V. Simon D.M & Lutzoni F. 2005. Phylogenetics analyses suggest reverse splicing spread of group I introns in fungal ribosomal RNA. *BMC Evolutionary Biology* 5 (68): 1-11.
- Belfort M. & Perlman P.S. 1995. Mechanisms of intron mobility. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (51): 30237-30240.
- Bold, H.C. & Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae*. Prentice- Hall, Englewood Cliffs, N.J. pp.720.
- Boon G.C., Floyd G.L. & Fuerst P.A. 2004. Multiple group I introns detected in the nuclear small subunit rDNA of the asexual green algae *Selenastrum capricornutum*. *Current Genetics* 46: 228-234.
- Broom, J.E., Jones, W.A., Hill, D.F., Knight, G.A. & Nelson, W.A. 1999. Species recognition in New Zealand *Porphyra* using 18S rDNA sequencing. *Journal of Applied Phycology* 11: 421-428.
- Broom J.E., Nelson W.A., Yarish C., Jones W.A, Aguilar Rosas R. & Aguilar Rosas L.E. 2002. A reassessment of the taxonomic status of *Porphyra suborbiculata*, *Porphyra carolinensis* and *Porphyra lilliputiana* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *European Journal of Phycology* 37: 227-235.
- Butterfield, N.J., Knoll A.H. & Swett, K. 1990. A bangiophyte red alga from the Proterozoic of Arctic Canada. *Science* 250: 104-107.
- Campbell, S.E. 1980. *Paleoconchocelis starmachii*, a carbonate boring microfossil from the Upper Silurian of Poland (425 million years old): implications for the evolution of the Bangiaceae (Rhodophyta). *Phycologia* 19(1): 25-36.

- Cech, T.R. 1988. Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis – a review. *Gene* 73: 259-271.
- Cech, T.R. 1990. Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543-568.
- Cech, T.R. & Bass, B.L. 1986. Biological catalysis of RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 599-629.
- Chiasson, W.B., Machesky & Vis, M. L. 2003. Phylogeography of a freshwater red alga *Batrachospermum helminthosum* in North America. *Phycologia* 42 (6): 654-660.
- Cohen S., Faugeron S., Martinez E.A., Correa J.A., Viard F., Destombe C. & Valero M. 2004. Molecular identification of two sibling species under the name *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Journal of phycology* 40: 742-747.
- Coll, J. & Oliveira, E.C. 1976. The genus *Porphyra* C.Ag. Rhodophyta - Bangiales in the American South Atlantic. II. Uruguayan species. *Botanica Marina* 19: 191-196.
- Coll, J. & Oliveira, E.C. 2001. *Porphyra drewiana*, a new species of red algae (Bangiales, Rhodophyta) from Brazil. *Phycological Research* 49: 67-72.
- De Wachter, R., Neefs, J.M., Goris, A. & Van de Peer, Y. 1992. The gene coding for small ribosomal subunit RNA in the basidiomycete *Ustilago maydis* contains a group I intron. *Nucl. Acids Res.* 20: 1251-1257.
- Dujon B. 1989. Group I intron as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations – a review. *Gene* 82: 91-114.
- FAO. 2003. Review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886, Rev. 2, Inland Water resources and Aquaculture Service, Fishery Resources Division, FAO Fisheries Department, Rome.
- Freshwater D.W., Fredericq S., Butler B.S., Hommersand M.H. & Chase M.W. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7281-7285.
- Fujiwara J., Iwahashi H., Someya J. & Nishikawa S. 1993. Structure and cotranscription of the plastid-encoded *rbcL* and *rbcS* genes of *Pleurochrysis carterae* (Prymnesiophyta). *Journal of Phycology* 29: 347-355.
- Gabrielson P.W., Garbary D.J. & Scagel R.F. 1985. The nature of ancestral red algae: inferences from a cladistic analysis. *Biosystems* 18: 335-346.
- Goff L.J., Moon D.A. & Coleman A.W. 1994. Molecular delineation of species and species relationship in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of phycology* 30: 521-537.
- Golden B.L., Gooding A.R., Podell E.R. & Cech T.R. 1998. A preorganized active site in the crystal structure of the *Tetrahymena* ribozyme. *Science* 282: 259-264.
- Haugen P., Runge H.J. & Bhattacharya D. 2004a. Long term evolution of the S788 fungal nuclear small subunit rRNA group I introns. *RNA* 10: 1084-1096.
- Haugen P., Reeb V., Lutzoni F. & Bhattacharya D. 2004b. The evolution of homing endonuclease genes and group I introns in nuclear rDNA. *Molecular Biology and Evolution* 21(1): 129-140.
- Haugen P., Simon D.M. & Bhattacharya D. 2005. The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* 21(2): 111-119.

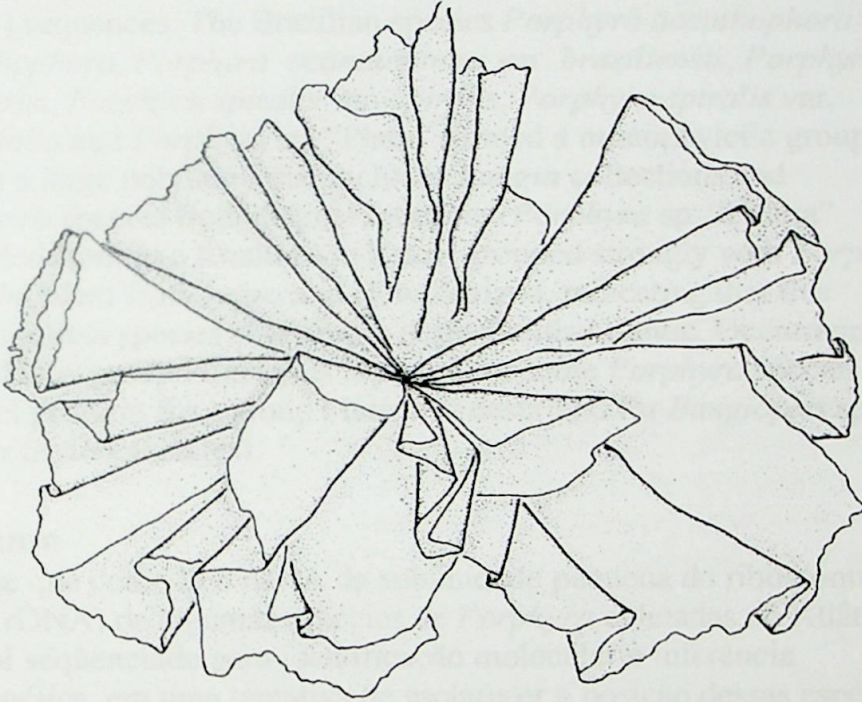
- Hibbett D.S. 1996. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* 13:903-917
- Johansen S. & Haugen P. 2001. A new nomenclature of group I introns in ribosomal DNA. *RNA* 7: 935-936.
- Klein A.S., Mathieson A.C., Neefus C.D., Cain D.F., Taylor H.A., Teasdale B.W., West A.L., Herhe E.J., Brodie J., Yarish C. & Wallace A.L. 2003. Identification of north-western Atlantic *Porphyra* (Bangiaceae, Bangiales) based on sequence variation in nuclear SSU and plastid *rbcL* genes. *Phycologia* 42: 109-122.
- Kunimoto, M., Kito, H., Yamamoto, Y., Cheney, D.P., Kaminishi, Y. & Mizukami, Y. 1999a. Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Applied Phycology* 11: 203-209.
- Kunimoto, M., Kito, H., Kaminishi, Y., Mizukami, Y. & Murase, N. 1999b. Molecular divergence of the SSU rRNA gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phyc.* 11: 211-216.
- Kunimoto, M., Kito, H., Mizukami, Y., Murase, N. & Levine, I. 2003. Molecular features of a defined genetic marker for the determination of the *Porphyra tenera* lineage. *Journal of applied phycology*. 15: 337-343.
- Lambowitz, A. M. & Belfort M. 1993. Intron as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 587-622.
- Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press Inc. New York, EUA, pp. 990.
- Lindstrom, S.C. & Fredericq, S. 2003. *rbcL* gene sequences reveal relationships among north-east Pacific species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) and a new species, *P. aestivalis*. *Phycological Research* 51: 211-224.
- Maggs C.A., Douglas S.E., Fenety J. & Bird C. J. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of phycology* 28: 214-232.
- Marston M. & Bohnsack M. V. 2002. Genetic variability and potential sources of *Gratoloupa doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island waters (USA). 2002. *Journal of Phycology* 38: 649-658.
- Michel F. & Westhof E. 1990. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Molecular Biology* 216: 585-610.
- Michel F., Jacquier A. & Dujon B. 1982. Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure. *Biochimie.* 64: 867-881.
- Milstein, D. 2002. *Filogenia molecular de espécies de Porphyra (Bangiales, Rhodophyta) do Atlântico Sul*. Dissertação de Mestrado, Depto. de Botânica, IB-USP, pp. 82.
- Miura, A. 1998. Asakusa-nori. In Japan Fisheries Resource Conservation Association (Ed.) *Data Book of Rare Aquatic Animals and Plants of Japan*. pp. 298-9.
- Miura A. & Aruga Y. 1987. Distribution of *Porphyra* in Japan as affected by cultivation. *Journal Tokio Univ. Fish.* 74: 41-50.
- Müller, K.M., Sheath, R.G., Vis, M.L., Crease, T.J. & Cole, K.M. 1998. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the

- RuBisCo spacer, *rbcL* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. 1. North America. *Phycologia* 37: 195-207.
- Müller K.M., Cannone J.J., Gutell R.R. & Sheath R.G. 2001a. A Structural and Phylogenetic Analysis of the Group IC1 Introns in the Order Bangiales (Rhodophyta). *Molecular Biology and Evolution* 18: 1654-1667.
- Müller K.M., Oliveira M.C., Sheath R.G. & Bhattacharya D. 2001b. Ribosomal DNA phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the origin of secondary plastids. *American Journal of Botany* 88: 1390-1400.
- Müller K. M., Cole K. M. & Sheath R.G. 2003. Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in North America. II. Biogeographical trends in karyology: chromosome numbers and linkage with gene sequence phylogenetic trees. *Phycologia* 42 (3): 209-219.
- Müller K. M., Thompson S. L., Cannone J. J. & Sheath R.G. 2005. A molecular phylogenetic analysis of the Bangiales (Rhodophyta) and description of a new genus, *Pseudobangia*. *Phycologia* 45: 146-155.
- Mumford, T.F. & Miura, A. 1988. *Porphyra* as food: cultivation and economics. In Lembi, C.A. & Waaland, J.R. (eds.), *Algae and Human Affairs*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 87-117.
- Muscarella D.E. & Vogt V.M. 1989. A mobile group I intron in the nuclear rDNA of *Physarum polycephalum*. *Cell* 56: 443-454.
- Neefus, C.D., Mathieson, A.C., Yarish, C., Klein, A., West A., Teasdale, B. & Hehre, E.J. 2000. Five cryptic species of *Porphyra* from the Northwest Atlantic. *Journal of Phycology* Suppl. 36(3):73.
- Neefus, C.D., Mathieson, A.C., Klein, A., West A., Teasdale, B., Bray T. & Yarish C. 2002. *Porphyra birdie* sp. nov. (Bangiales, Rhodophyta): a new species from the north-west Atlantic. *Algae*. 17: 203-16.
- Nelson W.A., Broom J.E. & Farr T.J. 2001. Four new species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from the New Zealand region described using traditional characters and 18S rDNA sequence data. *Cryptogamie, Algologie* 22: 263-284.
- Nelson W. A., Farr T.J. & Broom J.E. 2005. *Dione* and *Minerva*, two new genera from New Zealand circumscribed for basal taxa in the Bangiales (Rhodophyta). *Phycologia* 44: 133-138.
- Nikoh, N. & Fukatsu, T. 2001. Evolutionary dynamics of multiple group I introns in the nuclear ribosomal RNA genes of the endoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Mol. Biol. Evol.* 18(9): 1631-1642.
- Niwa K., Kikuchi N. & Aruga Y. 2005. Morphological and molecular analyses of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 41: 294-304.
- Noda, H. & Iwata, S. 1983. *A handbook for improvement of laver products; a new edition*. The National Laver and Shellfish Fishery Cooperative Associations, Tokyo, Japan, pp. 1-292. (In Japanese).
- Oliveira, E.C. 1977. *Algas Marinhas Bentônicas do Brasil*. Tese de Livre Docência, IB-USP, pp.407.
- Oliveira, E.C. & Coll, J. 1975. The genus *Porphyra* C. Ag. (Rhodophyta-Bangiales) in the American South Atlantic. I. Brazilian species. *Bot. Mar.* 18: 191-197.

- Oliveira, M.C. 1993. *Filogenia de Porphyra spp. (Rhodophyta): Sequenciamento do gene nuclear para o RNA da subunidade pequena do ribossomo (rDNA 18S) e estudos morfológicos da fase conchocelis*. Tese de Doutorado, Depto. Botânica, IB-USP, pp.160.
- Oliveira, M.C. & Ragan, M.A. 1994. Variant forms of a group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Mol. Biol. Evol.* 11:195-207.
- Oliveira, M.C. & Bhattacharya, D. 2000. Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. *American Journal of Botany* 87(4): 482-492.
- Oliveira M.C., Kurniawan J., Bird C.J., Rice E.L., Murphy C.A., Singh R.K., Gutell R.R. & Ragan M.A. 1995. A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiophycidae, Rhodophyta) based on sequences of the nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. *Phycological Research* 43: 71-79.
- Ragan, M.A., Bird, C.J., Rice, E.L. & Singh, R.K. 1993. The nuclear 18S ribosomal RNA gene of the red alga *Hildenbrandia rubra* contains a group I intron. *Nucl. Acids Res.* 21: 3898.
- Ragan M.A., Bird C.J., Rice E.L., Gutell R.R., Murphy C.A. & Singh R.K. 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7276-80.
- Saunders G.W. & Hommersand M.H. 2004. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *Amer. Journ. Bot.* 91(10): 1494-1507.
- Sheath R.G. & Cole K. M. 1984. Systematics of *Bangia* (Rhodophyta) in North America. I. Biogeographic trends in morphology. *Phycologia* 23: 383-396.
- Sogin, M.L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In Innes, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, pp. 307-314.
- Stiller, J.W. & Waaland, J.R. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 29(4): 506-517.
- Suh S.O., Jones K.G. & Blackwell. 1999. A group I intron in the nuclear small subunit rRNA gene of *Cryptendoxyla hypophloia*, an ascomycetous fungus: evidence for a new major class of group I introns. *J. Mol. Evol.* 48: 493-500.
- Teasdale B., Lindstrom S.C., Fredericq S., Neefus C.D., Mathieson A.C., Taylor H., West A.L., Mercado S.T., Piche N. & Klein A.S. 2000. Analysis of *Porphyra rbcL* demonstrates multiple migrations occurred between the North Atlantic and North Pacific. *Journal of Phycology* 36, supplement: 65.
- Teasdale B., West A., Taylor H. & Klein A. 2002. A simple restriction fragment length polymorphism (RLFP) assay to discriminate common *Porphyra* (Bangiophycidae, Rhodophyta) taxa from the Northwest Atlantic. *Journal of Applied Phycology* 14: 293-298.
- Wild M.D. & Gall J.G. 1979. An intervening sequence in the gene coding for 25S ribosomal RNA of *Tetrahymena pigmentosa*. *Cell* 16: 565-573.

- Woodson S.A. & Cech T.R. 1989. Reverse splicing of the *Tetrahymena* group I intron: implication for the directionality of splicing and for intron transposition. *Cell* 57: 335-345.
- Xiao S., Zhang Y. & Knoll A.H. 1998. Three-dimensional preservation of algae and animal embryos in a Neoproterozoic phosphorite. *Nature* 391: 553-558.
- Yoneshigue Y. 1985. *Taxonomie et Ecologie des Algues Marine dans la Region de Cabo Frio (RJ, Bresil)*. Thèse de Docteur d'Etat-Sciences, Univ. d'Aix-Marseille II. pp.454.
- Yoshida T., Notoya, M., Kikuchi, N. & Miyata, M. 1997. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography. *Nat. Hist. Res. Special Issue* 3: 5-18.
- Zaug A.J., Grabowski P.J. & Cech T.R. 1983. Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction *Nature* 301: 578-83.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 1997. Hybridization studies in *Bostrychia*. 2: Correlation of crossing data and plastid DNA sequence data within *B. radicans* and *B. moritziana* (Rhodophyta, Ceramiales). *Phycologia*. 36: 293-304.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 2002. Phylogeography of the *Bostrychia calliptera*-*B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41(1): 49-60.
- Zuccarello, G.C., Burger G., West, J. A. & King R. J. 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.

Capítulo 2



**Filogenia molecular de Bangiales (Rhodophyta) baseada no
seqüenciamento do gene nuclear SSU rRNA: Ênfase nas espécies
de *Porphyra* do Brasil**

Abstract

In an attempt to clarify the position of the South Atlantic *Porphyra* species within the order Bangiales, phylogenetic trees were inferred on the basis of the nuclear small subunit ribosomal RNA gene (SSU rDNA) sequences. The Brazilian species *Porphyra acanthophora* var. *acanthophora*, *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis*, *Porphyra drewiana*, *Porphyra spiralis* var. *spiralis*, *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* and *Porphyra* sp. "Piaui" formed a monophyletic group within a large polytomy that includes *Bangia* collections and *Porphyra* species from distinct locations. *Porphyra* sp. "Baleia" collected from two localities in Brazil grouped strongly with *Porphyra suborbiculata* from Japan and New Zealand, indicating that this cosmopolitan species also occurs in the South Atlantic. Occurrence of SSU rDNA group I introns is reported for some *Porphyra* species and a novel position for a group I intron is described for *Bangiopsis* sp (Order Stylonematales).

Resumo

O gene que codifica o rRNA da subunidade pequena do ribossomo (SSU rDNA) de algumas espécies de *Porphyra* coletadas no Atlântico Sul foi seqüenciado para identificação molecular e inferência filogenética, em uma tentativa de esclarecer a posição dessas espécies dentro da ordem Bangiales. As espécies brasileiras *Porphyra acanthophora* var. *acanthophora*, *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis*, *Porphyra drewiana*, *Porphyra spiralis* var. *spiralis*, *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* e *Porphyra* sp. "Piaui" formaram um agrupamento monofilético em uma grande politomia que inclui populações de *Bangia* e espécies de *Porphyra* de diferentes localidades. A espécie *Porphyra* sp. "Baleia" coletada em duas localidades da costa brasileira agrupou com alto suporte com a espécie *Porphyra suborbiculata* (Japão e Nova Zelândia), indicando que esta espécie cosmopolita também ocorre no Atlântico Sul. Algumas espécies de *Porphyra* apresentam introns do grupo I inseridos no SSU rDNA, e *Bangiopsis* sp. (Ordem Stylonematales) apresentou um intron do grupo I em um novo sítio de inserção para o SSU rDNA de Rhodophyta.

Introdução

O gênero *Porphyra* C. Agardh pode ser encontrado em várias localidades da costa marítima brasileira, mas é mais abundante e diversificado nas regiões subtropicais (Oliveira 1977). As espécies descritas para o Brasil são: *Porphyra acanthophora* Oliveira & Coll var. *acanthophora*, *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* Oliveira & Coll, *Porphyra spiralis* Oliveira & Coll var. *spiralis*, *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Oliveira & Coll (Oliveira & Coll 1975), *Porphyra drewiana* Coll & Oliveira (Coll & Oliveira 2001), *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis, *Porphyra pujalsii* Coll & Oliveira e *Porphyra rizzinii* Coll & Oliveira. As três últimas espécies foram descritas para o Uruguai (Coll & Oliveira 1976) e posteriormente foram encontradas ocorrendo na zona de ressurgência no norte do Rio de Janeiro (Yoneshigue, 1985).

Yoshida *et al.* (1997) fizeram um levantamento das espécies de *Porphyra* descritas no mundo e reuniram 133 espécies, indicando que a taxonomia do grupo permanecia problemática. O gênero *Porphyra* apresenta uma morfologia simples, inclui espécies crípticas e algumas espécies apresentam plasticidade fenotípica (Stiller & Waaland 1993). Essas características dificultam a identificação das espécies, o que pode ser bastante problemático para um gênero com importância econômica. Além disso, a imprecisão na taxonomia do gênero pode levar ao comprometimento de estudos ecológicos e da maricultura (Brodie *et al.* 1996).

Esses obstáculos têm estimulado diversos autores a utilizar técnicas de biologia molecular para estudar o grupo. Na tentativa de esclarecer as relações evolutivas entre as diferentes espécies de *Porphyra*, análise de isozimas (Lindstrom & Cole 1992, 1993), RFLP (Stiller & Waaland 1993, Teasdale *et al.* 2002, Niwa *et al.* 2005), e RAPD (Kuang *et al.* 1998; Mizukami *et al.* 1998) foram bastante usadas. Atualmente, o seqüenciamento de DNA tem sido a técnica mais empregada para reconstrução filogenética do grupo e para identificação de espécies.

O SSU rDNA foi seqüenciado para reconstrução filogenética do gênero *Porphyra* (Oliveira 1993; Oliveira *et al.* 1995; Broom *et al.* 1999, Milstein 2002, Klein *et al.* 2003), para discriminação de espécies de *Porphyra* (Broom *et al.* 1999; Kunimoto *et al.* 1999a;

Nelson *et al.* 2001; Klein *et al.* 2003) e para biogeografia e sistemática de *Bangia* (Müller *et al.* 1998, 2003).

Foi reportada a ocorrência de introns do grupo I inseridos no gene nuclear SSU rDNA de alguns isolados de *Bangia* e *Porphyra* (Stiller & Waaland 1993; Oliveira & Ragan 1994; Müller *et al.* 1998; Kunimoto *et al.* 1999a; Müller *et al.* 2001a). Estes introns tem sido utilizados como marcadores moleculares para análises filogenéticas de *Bangia* e *Porphyra* (Müller *et al.* 2001a) e para discriminação de espécies de *Porphyra* (Broom *et al.* 2002, Milstein 2002).

O gene que codifica a subunidade grande (*rbcL*) da enzima ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) e o espaçador intergênico *rbcL-rbcS* também têm sido usados como marcadores moleculares para a ordem Bangiales. O gene *rbcL* é mais utilizado para filogenia e identificação de espécies de *Porphyra* (Neefus *et al.* 2000, Teasdale *et al.* 2000, Teasdale *et al.* 2002, Klein *et al.* 2003, Lindstrom & Fredericq 2003), sistemática e biogeografia de *Bangia* (Müller *et al.* 1998, 2003). O espaçador *rbcL-S* foi utilizado para inferir filogenia de diversas populações de *Bangia* (Müller *et al.* 1998), para distinguir diferentes espécies de *Porphyra* (Brodie *et al.* 1996, 1998; Teasdale *et al.* 2002, Niwa *et al.* 2005) e para filogenia de *Porphyra* (Teasdale *et al.* 2000).

O espaçador intergênico dos genes que codificam a subunidade 2 (*cox2*) e 3 (*cox3*) da enzima citocromo oxidase tem sido utilizado como marcador mitocondrial em análises populacionais de espécies de Rhodophyta, como *Grateloupia doryphora* (Montagne) M. Howe (Marston & Bohnsack 2002), *Bostrychia calliptera* (Montagne) Montagne (Zuccarello & West 2002), *Batrachospermum helminthosum* Bory (Chiasson *et al.* 2003) e *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. Mc-Lachlan & E.C. Oliveira (Cohen *et al.* 2004).

Neste trabalho foi seqüenciado o SSU rDNA nuclear de algumas espécies de *Porphyra* e de uma espécie de *Bangiopsis*, para reconstrução filogenética e discriminação de espécies. Os introns que ocorrem no SSU rDNA foram seqüenciados quando presentes. Foram seqüenciados também os espaçadores *rbcL-S* e *cox2-3*, para 3 espécies de *Porphyra*. Seqüências do SSU rDNA de *Bangia* e *Porphyra* disponíveis no GenBank foram incluídas nas análises, para verificar a posição das espécies brasileiras dentro da ordem Bangiales.

Material e Métodos

1. Obtenção das amostras de *Porphyra*:

As amostras coletadas para esse trabalho estão listadas na Tab.2.1. Os talos gametofíticos foram limpos e triados para remoção de epífitas com o auxílio da lupa, e posteriormente foram preservados em sílica gel. Parte do material foi depositada no Herbário Ficológico (SPF) do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Tabela 2.1. Espécies de *Porphyra* seqüenciadas e informações de coleta. (SPF, Herbário Ficológico de Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).

Espécies	Local de coleta	Coletor	Data	Voucher n°
<i>Bangiopsis</i> sp.	Ilha do Cardoso, SP	S.P. Guimarães	15 Abr 2002	SPF 56145
<i>Porphyra drewiana</i>	Vitória, ES	E.C. Oliveira	21 Out 1998	SPF 55994
<i>Porphyra</i> sp. "Baleia"	São Sebastião, SP	D. Milstein	2 Ago 2002	SPF 56144
<i>Porphyra</i> sp. Piauí	Parnaíba, PI	E.C. Oliveira	26 Abr 2002	SPF 56150
<i>Porphyra</i> sp. "Arraial do Cabo 1"	A. do Cabo, RJ	E.C. Oliveira	6 Nov 2004	SPF 56175
<i>Porphyra</i> sp. "Arraial do Cabo 2"	A. do Cabo, RJ	E.C. Oliveira	6 Nov 2004	SPF 56176
<i>Porphyra</i> sp. "Uruguai"	La Calavera, Cabo Polonio Uruguai	H. Peluffo	26 Nov 2004	SPF 56177
<i>Porphyra</i> sp. "Itanhaém"	Itanhaém, SP	M.C. Oliveira	-	SPF 56178
<i>Porphyra</i> sp. "Caiobá"	Caiobá, PR	F. Pelizzari	30 Jul 2005	SPF 56179
<i>Porphyra spiralis</i> var. <i>amplifolia</i>	Guarujá, SP	D. Milstein	1 Jul 2002	SPF 56180
<i>Porphyra spiralis</i> var. <i>spiralis</i>	Vila Velha, ES	E.C. Oliveira	Jul 1998	SPF 56149

2. Extração de DNA:

As algas foram maceradas em nitrogênio líquido para a lise de tecidos e células. A extração de DNA foi feita com o "kit" de extração "Dneasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Santa Clarita, EUA), de acordo com o protocolo do fornecedor. Após a extração, o DNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com

brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989) para averiguação da qualidade e quantidade de DNA extraído.

3. Amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase):

Os “primers” utilizados nas PCR e reações de seqüenciamento estão listados na Tabela 2.2. Os “primers” 18S5’ e 18S3’ foram utilizados para a amplificação do SSU rDNA. Devido à presença de introns em algumas amostras, foi necessário amplificar o SSU rDNA em duas partes sobrepostas, usando-se os “primers” 530F e 536R combinados com 18S3’ e 18S5’ respectivamente. Os “primers” F993 e RBCS3’R foram utilizados para a amplificação do espaçador *rbcL-S*. Para a amplificação do espaçador *cox2-3*, foram utilizados os “primers” COX 2F e COX 3R.

As condições de amplificação para um volume final de 50 µL foram: 1X tampão de PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada “primer”, aproximadamente 2 ng de DNA e 1.25 U de *Taq* DNA polymerase (GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, EUA). Todas as reações de PCR foram feitas na termocicladora GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os ciclos da PCR variaram de acordo com a região a ser amplificada, conforme segue:

- SSU rDNA - 94°C por 4 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min; e a extensão final a 72°C por 7 min.
- Espaçador *rbcL-S* - 94°C por 4 min; 35 ciclos a 94°C por 1 min, 42°C por 1 min, 72°C por 1 min e 30 seg; e a extensão final a 72°C por 10 min.
- Espaçador *cox2-3* - 94°C por 4 min; 5 ciclos a 93°C por 1 min, 45°C por 1 min, 72°C por 1 min; seguido por 30 ciclos a 93°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg; e a extensão final a 72°C por 5 min.

Após a reação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989) para verificação do tamanho e quantidade de DNA amplificado. Para garantir a pureza dos reagentes nas PCR, foram feitos controles negativos com todos os reagentes menos o DNA. Para minimizar

eventuais erros de incorporação de bases durante a PCR, no mínimo três reações independentes foram reunidas antes do material ser seqüenciado (Baldwin *et al.* 1995). Os produtos da PCR foram purificados em colunas MicroSpin™ S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA) e foram diretamente seqüenciados.

Tabela 2. 2. “Primers” usados para amplificação e seqüenciamento do SSU rDNA, espaçador *rbcL-S* e espaçador *cox2-3*. “Primers” obtidos ou modificados de: (a) Sogin 1990 (b) Milstein & Oliveira 2005, (c) Bird *et al.* 1992 (d) Zuccarello *et al.* 1999b (e) Oliveira & Ragan 1994 (f) Freshwater *et al.* 1994.

Primers	Seqüências	Marcador Molecu (posição em <i>P. sp.</i> <i>var. amplifolia</i>)
18S5' (a)	5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	SSU rDNA (1)
530F (b)	5'-GAGGGCAAGTCTGGTG-3'	SSU rDNA (550)
690F (c)	5'-TCTCAGAGGTGAAATTCT-3'	SSU rDNA (912)
1055F (c)	5'-GGTGGTGCATGGCCG-3'	SSU rDNA (1286)
1400F (e)	5'-TGTACACACCGCCCGTC-3'	SSU rDNA (1659)
18S3' (a)	5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA-3'	SSU rDNA (2860)
1400R (c)	5'-ACGGGCGGTGTGTACA-3'	SSU rDNA (1676)
1055R (c)	5'-CGGCCATGCACCACC-3'	SSU rDNA (1300)
690R (c)	5'-AGAATTTACCTCTG-3'	SSU rDNA (929)
536R (c)	5'-GAATTACCGCGGCTGCTG-3'	SSU rDNA (584)
COX 2F (d)	5'-GTACCWCTTTTDRGRRKDAAATGTGATGC-3'	<i>cox 2-3</i> (1)
COX3R (d)	5'-GGATCTACWAGATGRAAWGGATGTC-3'	<i>cox 2-3</i> (433)
F993 (f)	5'-GGTACTGTTGTAGGTAAATTWGAAGG-3'	<i>rbcL - S</i> (1)
RBCS3'R (f)	5'-GTTCTTGTGTTAATCTCAC-3'	<i>rbcL - S</i> (571)

4. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi feito com aproximadamente 40 ng de produto de PCR purificado, 3.2 pmol de “primer” e o “kit” de seqüenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O “kit” de seqüenciamento é composto por: dNTP, dideoxynucleosídeos (ddNTP) com marcadores fluorescentes, tampão, cloreto de magnésio e a enzima *Taq* polimerase. Os “primers” que foram utilizados estão listados na Tabela 2.2. As reações de amplificação foram feitas na termocicladora MiniCycler (MJ Research), com 40 ciclos a 96°C por 10 seg, 54°C por 20 seg e 60°C por 4 min. Os produtos da PCR contendo os ddNTPs marcados foram precipitados em isopropanol 75% e lavados em etanol 70%, para a remoção de resíduos não incorporados que podem afetar a qualidade das seqüências. As amostras foram seqüenciadas nos seqüenciadores automáticos ABI PRISM™ 310 ou ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas nas direções direta e reversa foram manualmente alinhadas no programa ESEE 3.2 (Cabot & Beckenbach 1989) para a geração de uma seqüência consenso por amostra. Eventualmente, nucleotídeos diferentes ocorreram na mesma posição para a mesma amostra. Nesses casos, os cromatogramas das seqüências foram analisados para confirmar os resultados. As seqüências consenso foram identificadas por comparação com seqüências disponíveis no GenBank através do programa BLASTN (Altschul *et al.* 1990). As seqüências foram submetidas ao GenBank e os respectivos números de acesso, estão listados na Tabela 2.3.

5. Alinhamentos e inferência filogenética

As seqüências do SSU rDNA de *Porphyra* obtidas neste trabalho e as seqüências do SSU rDNA das espécies importadas do GenBank (Tabela 2.3) foram alinhadas manualmente no programa ESEE 3.2. Informações da estrutura secundária do SSU rDNA, obtidas no banco de dados “The European Small Subunit Ribosomal RNA database” (Van de Peer *et al.* 2000) foram utilizadas como guias nos alinhamentos. Também foram incluídas nos alinhamentos as espécies escolhidas como grupo externo: *Bangiopsis subsimplex* (Montagne) Schmitz (GenBank accession no. AF168627) *Bangiopsis* Schmitz sp.

(este trabalho), *Erythrotrichia carnea* (Dillwyn) J. Agardh (L26189) e *Erythrocladia* Rosenvinge sp. (L26188). Sequências correspondentes aos “primers” de amplificação 18S5’ e 18S3’, introns, inserções/deleções (indels) e regiões variáveis que poderiam ser alinhadas com ambigüidade, foram removidas dos alinhamentos gerando uma matriz de 32 seqüências com 1733 posições. A partir de uma matriz de seqüências homólogas de nucleotídeos é possível gerar árvores através de diferentes métodos de reconstrução filogenética.

Todas as análises filogenéticas foram feitas no programa PAUP 4.0b8 (Swofford 2000). O modelo evolutivo apropriado foi selecionado no Modeltest (Posada & Crandall 1998). O modelo escolhido, estimado a partir dos dados da matriz, foi Tamura & Nei (1993) com as seguintes freqüências de base: A = 0.2591, C = 0.2023, G = 0.2607, T = 0.2780. O modelo de substituição de bases foi determinado como $[A \leftrightarrow C, A \leftrightarrow T, C \leftrightarrow G, G \leftrightarrow T] = 1.0000$, $[A \leftrightarrow G] = 2.1963$ e $[C \leftrightarrow T] = 4.6683$. A proporção de sítios invariáveis considerada foi de 0.4787 e o parâmetro de distribuição gama foi de 0.5571 para taxa de heterogeneidade em sítios variáveis. As árvores foram inferidas a partir de três métodos distintos: distância, máxima parcimônia e máxima verossimilhança.

Para o método de distância, foi construída uma árvore de neighbour-joining “NJ” (Saitou & Nei 1987) com o modelo de substituição de Tamura & Nei (1993). A árvore de máxima parcimônia (MP) foi inferida por busca heurística. As árvores iniciais foram obtidas pelo algoritmo “stepwise addition” ou adição passo a passo, com adição de seqüências ao acaso (10 replicatas) e rearranjadas pelo algoritmo “branch-swapping: tree bisection-reconnection” (TBR). Foram considerados 435 sítios de parcimônia informativos. Em ambas as árvores de NJ e MP, as lacunas foram consideradas como dados ausentes e foi dado o mesmo peso para todos os sítios. Análises de “bootstrap” (Felsenstein 1985) foram feitas com 2000 replicatas para os métodos descritos acima.

A árvore de máxima verossimilhança (ML) foi inferida por busca heurística, sendo as árvores iniciais obtidas por adição passo a passo e rearranjadas com o algoritmo TBR, como descrito para a árvore de MP. As outras especificações foram estimadas pelo Modeltest, conforme descrito acima para a árvore de NJ. A reamostragem por “bootstrap” foi feita para 42 replicatas devido a limitações computacionais.

Para todas as análises, os valores de “bootstrap” foram considerados baixos até 70%, moderados de 71% a 90% e altos acima de 90%.

Tabela 2.3. Sequências do SSU rDNA de isolados de *Bangia* e de espécies de *Porphyra* incluídas neste trabalho.

Coleções	Nº de Acesso GenBank	Local de Coleta	Referência
<i>Bangia fuscopurpurea</i>	AF175530	Antártica	Müller <i>et al.</i> 2001a
<i>Bangia fuscopurpurea</i>	AF175531	Austrália	Müller <i>et al.</i> 2001a
<i>Bangia fuscopurpurea</i>	AF043363	Carolina do Norte, EUA ¹	Müller <i>et al.</i> 1998
<i>Bangia fuscopurpurea</i>	AF043357	Newfoundland, Canadá ¹	Müller <i>et al.</i> 1998
<i>Porphyra acanthophora</i> var. <i>acanthophora</i>	L26197	Brasil	Ragan <i>et al.</i> 1994
<i>Porphyra acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i>	AY766359	Brasil	Milstein 2002
<i>Porphyra amplissima</i>	L36048	Canadá ¹	Oliveira <i>et al.</i> 1995
<i>Porphyra capensis</i>	AY766361	África do Sul	Milstein 2002
<i>Porphyra cinnamomea</i>	AF136418	Nova Zelândia	Nelson <i>et al.</i> 2001
<i>Porphyra coleana</i>	AF136423	Nova Zelândia	Nelson <i>et al.</i> 2001
<i>Porphyra dentata</i>	AB013183	Japão	Kunimoto <i>et al.</i> 1999a
<i>Porphyra drewiana</i>	AY766362	Brasil	Milstein 2002
<i>Porphyra katadae</i>	AB013184	Japão	Kunimoto <i>et al.</i> 1999a
<i>Porphyra leucosticta</i>	L26199	Canadá ¹	Ragan <i>et al.</i> 1994
<i>Porphyra miniata</i>	L26200	Canadá ¹	Ragan <i>et al.</i> 1994
<i>Porphyra purpurea</i>	L26201	Canadá ¹	Ragan <i>et al.</i> 1994
<i>Porphyra rakiura</i>	AF136425	Nova Zelândia	Nelson <i>et al.</i> 2001
<i>Porphyra</i> sp. “Baleia”	AY766358	Brasil	Milstein & Oliveira 2005
<i>Porphyra</i> sp. “Uruguai”	*	Uruguai	Este trabalho
<i>Porphyra</i> sp. “Piauí”	AY766357	Brasil	Milstein & Oliveira 2005
<i>Porphyra</i> sp. GRB108	AF136420	Nova Zelândia	Broom <i>et al.</i> 1999
<i>Porphyra</i> sp. LGD30	AF136422	Nova Zelândia	Broom <i>et al.</i> 1999
<i>Porphyra spiralis</i> var. <i>spiralis</i>	AY766360	Brasil	Milstein 2002
<i>Porphyra spiralis</i> var. <i>amplifolia</i>	L26177	Brasil	Oliveira & Ragan 1994
<i>Porphyra suborbiculata</i>	AB013180	Japão	Kunimoto <i>et al.</i> 1999a
<i>Porphyra suborbiculata</i>	AF136424	Nova Zelândia	Broom <i>et al.</i> 1999
<i>Porphyra tenera</i>	AB013176	Japão	Kunimoto <i>et al.</i> 1999a
<i>Porphyra umbilicalis</i>	L26202	Canadá ¹	Ragan <i>et al.</i> 1994
<i>Porphyra yezoensis</i>	AB013177	Japão	Kunimoto <i>et al.</i> 1999a

¹ Atlântico Norte, * Sequência não submetidas

Resultados

SSU rDNA

O SSU rDNA foi completamente seqüenciado para as espécies: *Porphyra* sp. “Baleia” tem 1833 pares de bases (pb), *Porphyra* sp. “Piauí” tem 1840 pb, *Porphyra* sp. “Uruguai” tem 1831 pb e *Bangiopsis* sp. tem 1788 pb. Comparação entre os pares de espécies do Atlântico Sul está na Tabela 2.4. Os valores de identidade de nucleotídeos para o SSU rDNA entre as espécies brasileiras variaram de 92.7% a 99.8%.

O exon do SSU rDNA de *Porphyra* sp. “Baleia” é idêntico ao exon do SSU rDNA de *Porphyra suborbiculata* Kjellman do Japão (AB013180) e *P. suborbiculata* da Nova Zelândia (AF378665). O exon de *Porphyra* sp. “Uruguai” é idêntico ao exon do SSU rDNA de *Porphyra rakiura* W.A. Nelson da Nova Zelândia (AF136425). O exon do SSU rDNA de *Bangiopsis* sp. é 99.8% similar ao exon do SSU rDNA de *Bangiopsis subsimplex* (AF168627) apresentando apenas quatro substituições.

Tabela 2. 4. Porcentagem de similaridade entre seqüências de exon do SSU rDNA das espécies de *Porphyra* do Atlântico Sul. Seqüências correspondentes aos “primers” de amplificação 18S5’ e 18S3’ foram excluídas da comparação. Paa – *Porphyra acanthophora* var. *acanthophora*, Pab – *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, Pcap – *P. capensis*, Pdrew – *P. drewiana*, Psa – *P. spiralis* var. *amplifolia*, Pss – *P. spiralis* var. *spiralis*, Pbal – *Porphyra* sp. “Baleia”, Ppia – *Porphyra* sp. “Piauí”, Puru – *Porphyra* sp. “Uruguai”.

	Paa	Pab	Pcap	Pdrew	Psa	Pss	Pbal	Ppia
Paa	-	-	-	-	-	-	-	-
Pab	99.5	-	-	-	-	-	-	-
Pcap	90.7	90.9	-	-	-	-	-	-
Pdrew	93.6	93.9	91.2	-	-	-	-	-
Psa	93.5	93.8	91.2	99.8	-	-	-	-
Pss	93.4	93.7	91.0	99.7	99.7	-	-	-
Pbal	93.8	94.1	91.3	93.6	93.6	93.4	-	-
Ppia	95.1	95.4	90.6	93.0	92.9	92.7	93.1	-
Puru	94.7	95.0	92.1	95.2	95.2	95.2	96.2	94.2

Introns

A ocorrência de introns do grupo I no SSU rDNA foi observada para algumas espécies. O sítio de inserção dos introns é dado de acordo com a posição de referência do SSU rDNA em *E. coli*. Os introns S516 e S1506 quando presentes estão inseridos nas regiões flangeadoras do SSU rDNA: GTCTGGTG-CCAGCAGCC e CAAGGT-TTCCGTA, respectivamente.

Porphyra sp. “Baleia” e *Porphyra* sp. “Arraial do Cabo 1” apresentaram dois introns do grupo I, o primeiro inserido próximo à extremidade 5’ do SSU rDNA, intron S516, e o segundo inserido pouco antes da extremidade 3’ do SSU rDNA, intron S1506. Os introns S516 de *Porphyra* sp. “Baleia” e *P.* sp. “Arraial do Cabo 1” têm 492 pb e os introns S1506 têm 574 bp.

Os introns de *Porphyra* sp. “Baleia” e *Porphyra* sp. “Arraial do Cabo 1” foram comparados no programa BLASTN com outros introns de *Bangia* e *Porphyra*, mostrando os seguintes resultados: Os introns S516 e S1506 de *Porphyra* sp. “Baleia” e *Porphyra* sp. “Arraial do Cabo 1” são 100% idênticos aos introns S516 e S1506 de *P. suborbiculata* (AF378665) da Nova Zelândia.

Porphyra sp. “Uruguai” apresentou dois introns, S516 e S1506 com 542 pb e 526 pb respectivamente. Ambos os introns apresentaram 99.8% de identidade com os introns S516 e S1506 de *P. rakiura* (Nova Zelândia).

Porphyra sp. “Piauí” não apresentou introns no SSU rDNA. *Porphyra* sp. “Arraial do Cabo 2”, apresentou um intron S1506 com 1056 pb e 99.8% de identidade com o intron S1506 de *P. drewiana*. *Porphyra* sp. “Itanhaém” e *P.* sp. “Caiobá” apresentaram um intron S1506 com 1055 pb e 100% de identidade com o intron S1506 de *P. spiralis* var. *amplifolia*. *Bangiopsis* sp. apresentou um intron com 764 pb inserido na região flangeadora do exon do SSU rDNA, GGGGGGAGT-ATGGTCGCA, próximo ao sítio de inserção do intron S943 (Bhattacharya & Oliveira 2000). Este intron apresentou 47.9% de similaridade com o intron do grupo I que ocorre no LSU rDNA do Ascomycota *Pneumocystis carinii* (L13615).

Análises filogenéticas

As Figuras 2.1 e 2.2 exibem as árvores de NJ e MP, respectivamente. Os valores de “bootstrap” da árvore de ML foram plotados nos ramos

da árvore de MP. A estrutura das três árvores não é idêntica, embora a topologia geral seja bastante similar. A ordem Bangiales é monofilética com alto suporte (100%) para todas as análises, considerando os grupos externos aqui incluídos. As árvores apresentaram dois grupos irmãos monofiléticos, G1 (valores de bootstrap: 80% para NJ, 83% para MP e 93% para ML) e G2 (valores de “bootstrap”: 92% para NJ, 93% para MP e 100% para ML). Tanto G1 como G2 incluem populações de *Bangia* e espécies de *Porphyra* de diferentes localidades geográficas.

Em G1, um clado de *Bangia fuscopurpurea* (100% de “bootstrap” em todas as análises) enraíza um agrupamento de espécies de *Porphyra* (valores de “bootstrap”: 80% para NJ e 87% para MP), onde estão incluídas *P. capensis* da África do Sul, duas *Porphyra* sp. da Nova Zelândia e *P. umbilicalis* do Canadá (valores de “bootstrap”: 100% para NJ, 95% para MP e 93% para ML).

A estrutura interna do agrupamento G2 varia de acordo com o método filogenético inferido. *Bangia fuscopurpurea* do Canadá enraíza um grupo com alto suporte (valores de “bootstrap”: 100% para NJ, 99% para MP e 100% para ML), que inclui uma politomia com diversas espécies de *Porphyra* e com *B. fuscopurpurea* da Antártica. Nesta politomia, as espécies brasileiras com exceção de *Porphyra* sp. “Baleia”, formam um agrupamento monofilético com suporte de moderado a alto (valores de “bootstrap”: 89% para NJ, 91% para MP e 85% para ML), e as espécies *P.* sp. “Uruguai” e *P. rakiura* (Nova Zelândia) agrupam com 100% de “bootstrap” em todas as análises. Outro agrupamento com alto suporte (100% de “bootstrap” em todas as análises) inclui *Porphyra* sp. “Baleia” coletada na costa sudeste do Brasil e *P. suborbiculata* do Japão e da Nova Zelândia.

No clado das espécies brasileiras, é possível distinguir duas linhagens diferentes. A primeira linhagem é formada pela espécie *P. drewiana* e pelas duas variedades de *P. spiralis* (100% de “bootstrap” em todas as análises), e a segunda linhagem é formada pela espécie *Porphyra* sp. “Piauí” e as duas variedades de *P. acanthophora* (100% de “bootstrap” em todas as análises).

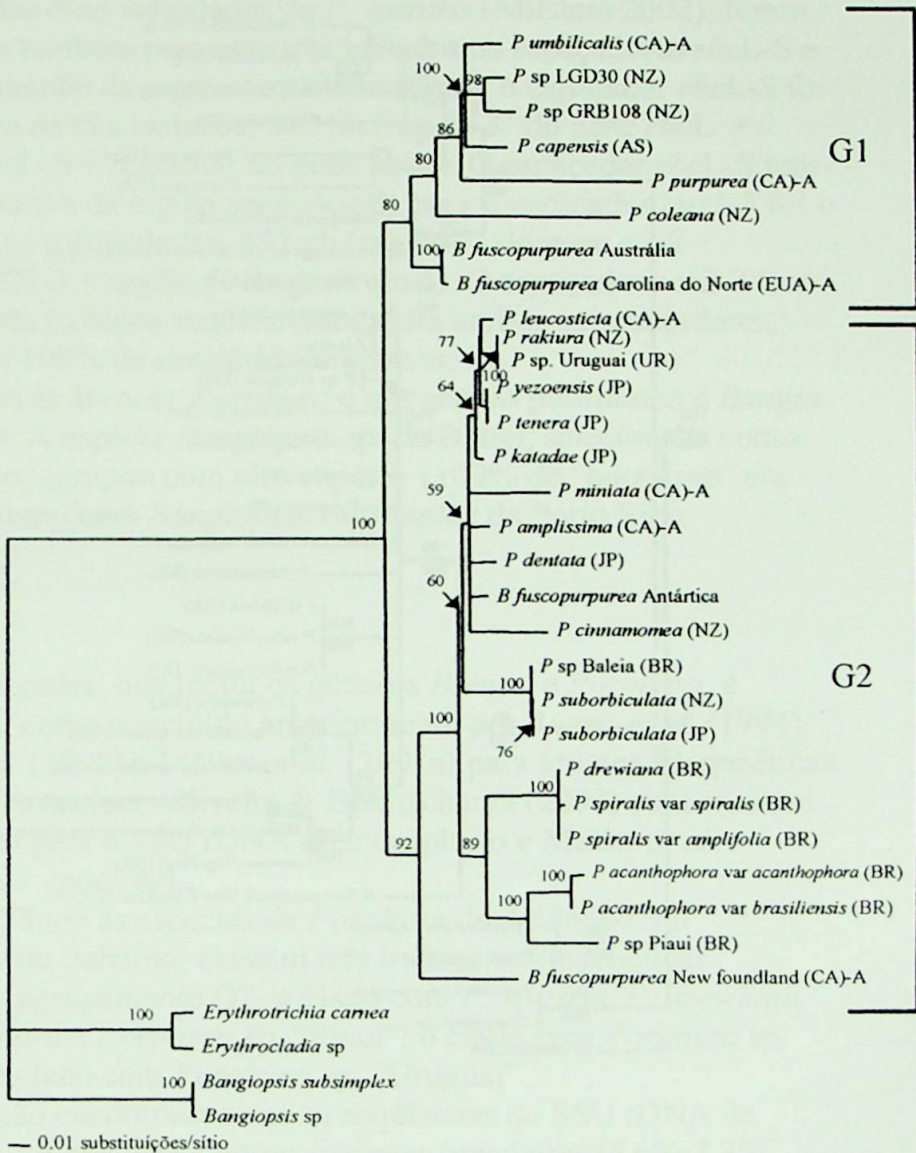


Fig. 2.1 Árvore de neighbor-joining (NJ) do SSU rDNA inferida com o modelo de substituição de Tamura and Nei. Os valores de bootstrap, efetuados para 2000 replicatas, estão indicados nos ramos. As flechas indicam a posição dos valores de bootstrap, quando não couberam nos ramos. Abreviaturas entre parêntesis indicam os locais de coleta. BR-Brasil, CA-Canadá, JP- Japão, NZ- Nova Zelândia, AS-África do Sul, EUA- Estados Unidos, UR- Uruguai. G1- grupo 1, G2 - grupo 2. A-Atlântico Norte.

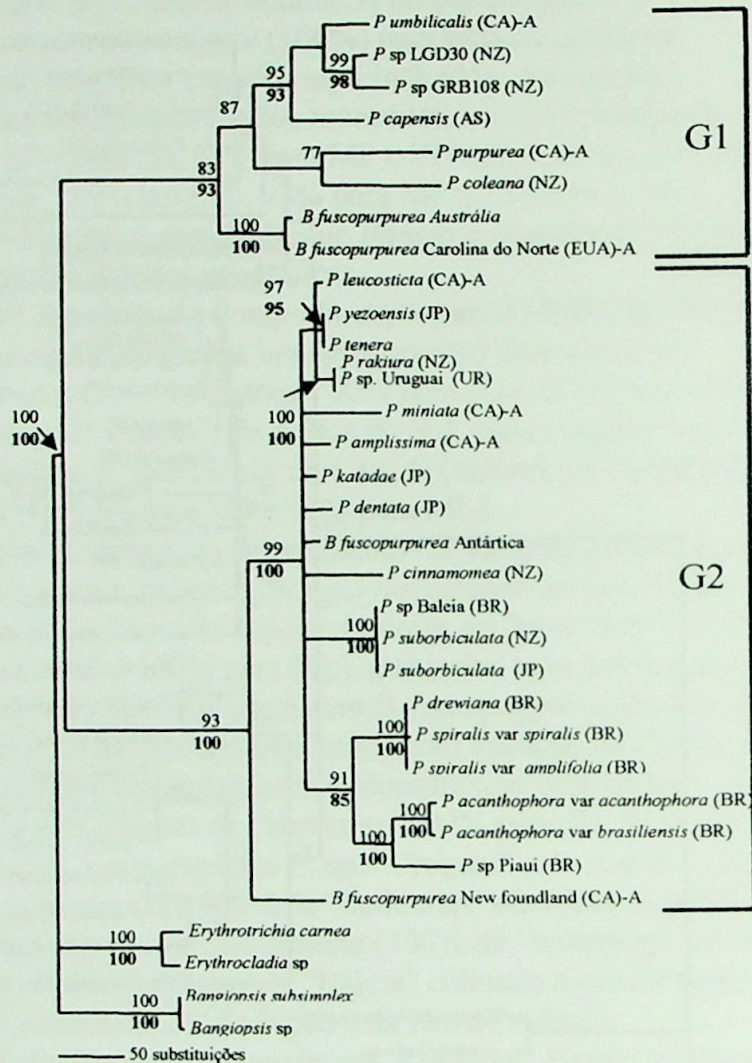


Fig. 2.2 Árvore de máxima parcimônia (MP) do SSU rDNA inferida por busca heurística. Os valores de bootstrap, efetuados para 2000 replicatas, estão indicados nos ramos (primeira linha, fonte normal); para a árvore de máxima verossimilhança, 42 replicatas de bootstrap (segunda linha, fonte em negrito). As flechas indicam a posição dos valores de bootstrap, quando não couberam nos ramos. Abreviaturas entre parêntesis indicam os locais de coleta. BR-Brasil, C- Canadá, JP- Japão, NZ-Nova Zelândia, AS-África do Sul, EUA- Estados Unidos, UR- Uruguai. G1- grupo 1, G2 - grupo 2. A- Atlântico Norte.

Devido a alta similaridade entre o SSUrDNA, intron e ITS de *P. drewiana* e das duas variedades de *P. spiralis* (Milstein 2002), foram seqüenciados também para esse três isolados os espaçadores *rbcL-S* e *cox2-3*. O tamanho da região seqüenciada para o espaçador *rbcL-S* foi o mesmo para os três isolados, 570 pb (região 3' do gene *rbcL* + espaçador *rbcL-S* + região 5' do gene *rbcS*). O espaçador *rbcL-S* tem 77 pb. O tamanho da região seqüenciada para o espaçador *cox2-3* foi o mesmo para os três isolados, 457 pb (região 3' do gene *cox2* + espaçador *cox2-3* + região 5' do gene *cox3*). O espaçador *cox2-3* tem 167 pb. Os três isolados seqüenciados, para ambos os espaçadores, apresentaram 100% de similaridade entre si.

Em todas as árvores, *Porphyra* é um gênero polifilético e *Bangia* é parafilético. A espécie *Bangiopsis* sp. do Brasil, selecionada como grupo externo, agrupou com alto suporte (100% de “bootstrap” em todas as análises) com *Bangiopsis subsimplex* de Porto Rico.

Discussão

A ordem Bangiales, que inclui os gêneros *Bangia* e *Porphyra*, é monofilética, como concluído anteriormente por Ragan *et al.* (1994), Oliveira *et al.* (1995) e Müller *et al.* (2001a) para árvores filogenéticas do SSU rDNA nuclear. Oliveira & Bhattacharya (2000) confirmaram esse resultado para o SSU rDNA do cloroplasto e Müller *et al.* (2001b) para o gene *rbcL*.

Considerando as espécies de *Porphyra* do Atlântico Sul analisadas neste trabalho, existem três linhagens filogenéticas diferentes no agrupamento G2, o clado com *P. spiralis*, *P. drewiana*, *P. acanthophora* e *Porphyra* sp. “Piauí”; o clado com *Porphyra* sp. “Baleia”; e o clado com *Porphyra* sp. “Uruguai”.

A variação encontrada entre as seqüências do SSU rDNA de *Porphyra* sp. “Piauí” e das outras espécies brasileiras (4.6%-7.3%; Tabela 2.4) sugere que *Porphyra* sp. “Piauí” é uma nova espécie ainda não descrita. Segundo Ragan *et al.* (1994), a variação entre o SSU rDNA de diferentes espécies de *Porphyra* pode ser acima de 5%. É interessante notar que *Porphyra* sp. “Piauí” apresenta dentes marginais microscópicos como ocorre em *P. acanthophora* (Oliveira & Coll 1975).

Porphyra acanthophora é diferenciada de *P. spiralis* principalmente pela presença de dentes microscópicos marginais no talo. *P. acanthophora* var. *acanthophora* é caracterizada por formar densos tufo rosulados de lâminas orbiculares, enquanto que *P. acanthophora* var. *brasiliensis* apresenta lâminas em forma de fita, que podem estar isoladas ou em pouca quantidade. *Porphyra spiralis* var. *spiralis* forma tufo de lâminas estreitas em formato de fitas torcidas ou com a margem dobrada, enquanto que a lâmina de *P. spiralis* var. *amplifolia* não é tão estreita nem torcida como a da variedade típica. O talo de *P. spiralis* var. *amplifolia* apresenta forma de fita ou fendas irregulares, em forma de folha, com as margens onduladas (Oliveira & Coll 1975) enquanto *P. drewiana* consiste tipicamente de uma lâmina inteira, orbiculada, alongada, lanceolada, umbilicada e cordata (Coll & Oliveira 2001). Todas as espécies citadas acima apresentam talo monostromático e um cloroplasto por célula.

A similaridade entre as seqüências do SSU rDNA (99.7% - 99.8%) de *P. spiralis* var. *amplifolia*, *P. spiralis* var. *spiralis* e *P. drewiana* (Milstein 2002) embora alta, está dentro do esperado para diferentes espécies. *P. yezoensis* e *P. tenera*, por exemplo, apresentam similaridade de 99.8% no SSU rDNA (Kunimoto *et al.* 1999a). Entretanto, a similaridade entre as seqüências do ITS (99.6% - 99.7%) de *P. spiralis* var. *amplifolia*, *P. spiralis* var. *spiralis* e *P. drewiana* (Milstein 2002), não está dentro do esperado para diferentes espécies. A similaridade entre o ITS de *P. yezoensis* e *P. tenera* variou de 88%-90% (Kunimoto *et al.* 1999b). A alta similaridade entre o ITS dos três espécimes e entre os introns de *P. spiralis* var. *amplifolia* e *P. drewiana* (99.6%) nos motivou a seqüenciar outras regiões genômicas para confirmar se *P. drewiana* poderia ser considerada uma nova variedade de *P. spiralis*, conforme sugerido por Milstein (2002).

Foram seqüenciados para esses três isolados, os espaçadores *rbcL-S* e *cox2-3*. As seqüências do *rbcL-S* são idênticas para os três isolados. A variação entre as seqüências dessa região, esperada para diferentes espécies de *Porphyra*, é de 1% a 14% (Brodie *et al.* 1996, 1998, Niwa *et al.* 2005). As seqüências do *cox2-3*, também são idênticas para os três isolados. A divergência entre as seqüências do *cox2-3*, para isolados de diferentes populações de *P. spiralis* var. *amplifolia*, foi de 0,2% a 0,7% (Capítulo 4). Com esses dados complementares, fica mais claro que *P. drewiana* deve ser

considerada mais uma variedade de *P. spiralis*. As três variedades são sustentadas pelas diferenças morfológicas citadas anteriormente, e pela pequena divergência encontrada entre o SSU rDNA, intron (no caso de *P. spiralis* var. *amplifolia* e *P. drewiana*) e ITS.

Porphyra suborbiculata (Japão), *P. lilliputiana* (Nova Zelândia) e *P. carolinensis* (Estados Unidos) foram colocadas em sinonímia sob o nome de *P. suborbiculata*, baseado em análises morfológicas, habitat e seqüências do SSU rDNA e ITS (Broom *et al.* 2002). As seqüências do SSU rDNA e dos introns de *Porphyra* sp. “Baleia” são idênticas às seqüências do SSU rDNA e dos introns de *P. suborbiculata*, portanto, nossos resultados estendem a distribuição de *P. suborbiculata* ao Atlântico Sul. Broom *et al.* (2002) sugeriram que essa pequena e cosmopolita espécie de *Porphyra* pode ter ampla distribuição, devido à atividade marítima de embarcações. Essa alga poderia crescer em cascos de navios e ser levada dessa forma, de uma região a outra. A fase conchocelis de *Porphyra* é mais propensa a dispersão, devido ao seu crescimento endolítico em conchas calcáreas de invertebrados vivos da região entre-marés (Paula & Oliveira 1993). Esses bivalves podem se fixar em cascos de embarcações, oferecendo um ambiente estável para a alga em sua fase perene. Outra fonte de dispersão poderia ser a introdução da ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) que foi transplantada para cultivo entre oceanos durante décadas, e é também um substrato apropriado para a fase conchocelis.

Para que todas as espécies de *Porphyra* descritas para o Brasil fossem incluídas nas análises filogenéticas, coletas na região de Cabo Frio-RJ (zona de ressurgência) foram feitas, na tentativa de encontrar *P. leucosticta*, *P. pujalsii* e *P. rizzinii* descritas para a região (Yoneshigue, 1985). *Porphyra* sp. “Arraial do Cabo 1” foi coletada como *P. pujalsii*. A identidade de 100% entre os introns desta e de *P. sp* “Baleia”, indica que *P. sp*. “Arraial do Cabo 1” é *P. suborbiculata*. *Porphyra* sp. “Baleia” é morfológicamente diferente das demais espécies brasileiras descritas. No entanto, o tamanho diminuto e a presença de dentes microscópicos nas margens do talo, sugerem certa semelhança com *P. pujalsii* (Coll & Oliveira 1976). Coll & Cox (1977) ao descreverem a espécie *P. carolinensis* (sinonimizada como *P. suborbiculata*), relataram a presença dos dentes microscópicos marginais. Por essa razão, Coll & Cox (1977) compararam *P. carolinensis* com as espécies *P. acanthophora* e *P. pujalsii*, mas

concluíram que *P. carolinensis* apresentava diferenças o suficiente para ser descrita como uma nova espécie.

Porphyra capensis da África do Sul (AY766361) agrupou com *Porphyra* sp. GRB108 (AF136420) e *Porphyra* sp. LGD30 (AF136422), ambas da Nova Zelândia, com identidade de 95% e 96% no SSU rDNA, respectivamente (Milstein 2002). De acordo com a teoria de Wegener da deriva continental (Kious & Tilling 1996), esperávamos que *P. capensis* e as espécies brasileiras tivessem divergido a partir de uma espécie ancestral comum, uma vez que a África e a América do Sul foram separadas há 65 milhões de anos (Final do período Cretáceo) e fósseis de *Porphyra* datam de 500 milhões de anos aproximadamente (Cambriano). No entanto, *P. capensis* parece ter tido uma origem diferente já que está mais próxima das espécies da Nova Zelândia do que das espécies brasileiras.

Outra espécie do Atlântico Sul a agrupar com uma espécie da Nova Zelândia foi *Porphyra* sp. "Uruguai", cujas seqüências do SSU rDNA são idênticas às seqüências do SSU rDNA de *P. rakiura* (AF136425). Em um estudo recente da flora de *Bangia* e *Porphyra* da Nova Zelândia, Broom *et al.* (2004) levantam a hipótese de que o hemisfério Sul não é apenas um centro de diversidade, mas um centro de origem para as Bangiales modernas. Portanto, a origem das espécies do Atlântico Sul podem ter ocorrido em dois momentos distintos: Há 115 milhões de anos (Início do Cretáceo), quando o bloco dos continentes América do Sul/África se separaram do bloco que incluía a Nova Zelândia, ou mais recentemente pela introdução de espécies novas ou por meio de embarcações.

A politomia que ocorre no grupo G2 (Fig. 2.1) poderia ser explicada pela rápida radiação de invertebrados marinhos com conchas que ocorreu no período Cambriano (Erwin 1991). Stiller & Waaland (1993) sugeriram que, como resultado dessa radiação, pode ter havido um aumento de habitats para a fase conchocelis, gerando assim uma oportunidade para o crescimento da diversidade de *Porphyra*. Portanto, as diferentes linhagens de *Porphyra* podem ter evoluído simultaneamente.

O tempo de divergência entre espécies de *Porphyra* e *Bangia* nas árvores inferidas não é possível de ser estimado, pois de acordo com Broom *et al.* (2004) não existe relógio molecular para o grupo devido à escassez de registros fósseis para esses organismos.

Bangiopsis sp. foi inicialmente identificada como *Bangia fuscopurpurea*. Ambos os gêneros apresentam um talo filamentosos plurisseriado e não ramificado (Joly 1967) o que levou a confusão. A identificação correta só foi possível quando a seqüência de SSU rDNA foi obtida, sendo 99.8% similar à seqüência de SSU rDNA de *Bangiopsis subsimplex*. A ocorrência de um intron do grupo I no SSU rDNA de *Bangiopsis* sp. foi um resultado inesperado.

Introns do grupo I foram descritos ocorrendo em genes nucleares que codificam o SSU rDNA e o LSU rDNA de protistas, genes mitocondriais de fungos, eubactérias e bacteriófagos (Sogin & Edman 1989, De Wachter *et al.* 1992, Lambowitz & Belfort 1993, Ragan *et al.* 1993, Oliveira & Ragan 1994, Bhattacharya *et al.* 1994, 1996, Bhattacharya & Oliveira 2000, Nikoh & Fukatsu 2001, Müller *et al.* 2001a, Broom *et al.* 2002). Introns do grupo I no SSU rDNA de Rhodophyta, foram descritos para algumas espécies da ordem Bangiales (Oliveira & Ragan 1994, Oliveira *et al.* 1995, Müller *et al.* 1998, Kunimoto *et al.* 1999a, Müller *et al.* 2001a, Broom *et al.* 2002, Milstein 2002) e para um táxon basal da classe Florideophyceae (*Hildenbrandia rubra*, Ragan *et al.* 1993). Como a ordem Bangiales é considerada grupo irmão da classe Florideophyceae em análises filogenéticas (Freshwater *et al.* 1994, Oliveira & Bhattacharya 2000, Müller *et al.* 2001b), supõe-se que um intron do grupo I teria se inserido em um táxon ancestral de Bangiales/Florideophyceae por transferência lateral, posteriormente teria sido transmitido para todos os descendentes por herança vertical, seguida por perdas múltiplas dentro do grupo (Bhattacharya *et al.* 2001). Com a descoberta de um intron do grupo I no SSU rDNA de *Bangiopsis* sp., um gênero pertencente a um clado filogenético na classe Rhodellophyceae (Saunders & Hommersand, 2004), a distribuição de introns do grupo I no SSU rDNA de algas vermelhas ficou ainda mais complicada.

Bangiopsis subsimplex (AF168627) não apresenta intron no SSU rDNA e *Bangiopsis* sp. apresenta. A ocorrência esporádica do intron no SSU rDNA, também já foi descrita para *Bangia* e *Porphyra* (Oliveira & Ragan 1994, Kunimoto *et al.* 1999a, Bhattacharya & Oliveira 2000, Müller *et al.* 2001a, Broom *et al.* 2002, Milstein 2002). A distribuição esporádica dos introns do grupo I sugere que esses elementos móveis podem sofrer transferência horizontal entre diferentes espécies e genes. Como conseqüência, o intron pode ser perdido da linhagem original, ou pode ser transmitido verticalmente

dentro da linhagem, como também pode movimentar-se dentro da linhagem com perda parcial ou fixação (Haugen *et al.* 2005).

O intron de *Bangiopsis* sp. S943 está inserido em uma nova posição no SSU rDNA para Rhodophyta. Não foi encontrada similaridade entre o intron S943 de *Bangiopsis* sp. e os outros introns descritos para as algas vermelhas. Apenas, certa similaridade com um intron do grupo I inserido no 26S rDNA do Ascomycota *Pneumocystis carinii* P. Delanoë & Delanoë, o que sugere uma origem diferente desse intron com relação aos introns do SSU rDNA das outras algas vermelhas.

Referências Bibliográficas

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Molecular Biology* 215: 403-410.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. & Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Bhattacharya, D. & Oliveira, M.C. 2000. The SSU rDNA coding region of a filose amoeba contains a group I intron lacking the universally conserved G at the 3'-terminus. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(6): 585-589.
- Bhattacharya, D., Surek, B., Rusing, M., Damberger, S. & Melkonian, M. 1994. Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear encoded rRNA of Zygnematales. *PNAS. USA.* 91: 9916-9920.
- Bhattacharya, D., Friedl, T. & Damberger, S. 1996. Nuclear-encoded rDNA group I intron: Origin and Phylogenetic relationship of insertion site lineages in the green algae. *Mol. Biol. Evol.* 13(7): 978-989.
- Bhattacharya D., Cannone J.J. & Gutell R.R. 2001. Group I intron lateral transfer between red and brown algal ribosomal RNA. *Current Genetics* 40: 82-90.
- Bird C.J., Rice E.L., Murphy C.A., Ragan M.A. 1992. Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. *Phycologia* 31: 510-522.
- Brodie, J., Hayes, P.K., Barker, G.L. & Irvine, L.M. 1996. Molecular and morphological characters distinguishing two *Porphyra* species (Rhodophyta: Bangiophycidae). *Eur. Jour. of Phycol.* 31: 303-308.
- Brodie, J., Hayes, P.K., Barker, G.L., Irvine, L.M. & Bartsch, I. 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophycidae, Rhodophyta) in the Northeast Atlantic based on the *rbcL-rbcS* intergenic spacer. *Journal of Phycology.* 34: 1069-1074.
- Broom, J.E., Jones, W.A., Hill, D.F., Knight, G.A. & Nelson, W.A. 1999. Species recognition in New Zealand *Porphyra* using 18S rDNA sequencing. *Journal of Applied Phycology* 11: 421-428.

- Broom J.E., Nelson W.A., Yarish C., Jones W.A, Aguilar Rosas R. & Aguilar Rosas L.E. 2002. A reassessment of the taxonomic status of *Porphyra suborbiculata*, *Porphyra carolinensis* and *Porphyra lilliputiana* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *European Journal of Phycology* 37: 227-235.
- Broom J.E.S, Farr T.J. & Nelson W.A. 2004. Phylogeny of the *Bangia* flora of New Zealand suggest a southern origin for *Porphyra* and *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta). *Mol. Phyl. Evol.* 31:1197-1207.
- Cabot, E. L. & Beckenbach, A. T. 1989. Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Comput. Appl. Biosci.* 5:233-4.
- Chiasson, W.B., Machesky & Vis, M. L. 2003. Phylogeography of a freshwater red algae *Batrachospermum helminthosum* in North America. *Phycologia* 42 (6): 654-660.
- Cohen S., Faugeron S., Martinez E.A., Correa J.A., Viard F., Destombe C. & Valero M. 2004. Molecular identification of two sibling species under the name *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Journal of phycology* 40: 742-747.
- Coll J. & Cox J. 1977. The genus *Porphyra* C. Ag. (Rhodophyta, Bangiales) in the American North Atlantic . I. New species from North Carolina. *Botanica Marina* 20: 155-159.
- Coll, J. & Oliveira, E.C. 1976. The genus *Porphyra* C.Ag. Rhodophyta - Bangiales in the American South Atlantic. II. Uruguayan species. *Botanica Marina* 19: 191-196.
- Coll, J. & Oliveira, E.C. 2001. *Porphyra drewiana*, a new species of red algae (Bangiales, Rhodophyta) from Brazil. *Phycological Research* 49: 67-72.
- De Wachter, R., Neefs, J.M., Goris, A. & Van de Peer, Y. 1992. The gene coding for small ribosomal subunit RNA in the basidiomycete *Ustilago maydis* contains a group I intron. *Nucl. Acids Res.* 20: 1251-1257.
- Erwin D.H. 1991. Metazoan phylogeny and the Cambrian radiation. *Trends in Ecol. and Evolution* 6: 131-134.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.
- Freshwater D.W., Fredericq S., Butler B.S., Hommersand M.H. & Chase M.W. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7281-7285.
- Haugen P., Simon D.M. & Bhattacharya D. 2005. The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* 21(2): 111-119.
- Joly A.B. 1967. *Gêneros de algas marinhas da costa Atlântica latino americana*. Editora da USP, SP, 464pp.
- Kious, W.J. & Tilling, R.I. 1996. This dynamic Earth: The story of plate tectonics. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
<http://pubs.usgs.gov/publications/text/dynamic.html>

- Klein A.S., Mathieson A.C., Neefus C.D., Cain D.F., Taylor H.A., Teasdale B.W., West A.L., Herhe E.J., Brodie J., Yarish C. & Wallace A.L. 2003. Identification of north-western Atlantic *Porphyra* (Bangiaceae, Bangiales) based on sequence variation in nuclear SSU and plastid *rbcL* genes. *Phycologia* 42: 109-122.
- Kuang M., Wang S., Li Y., Shen D. & Zeng C. 1998. RAPD study on some common species of *Porphyra* in China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 16, supplement: 140-145.
- Kunimoto, M., Kito, H., Yamamoto, Y., Cheney, D.P., Kaminishi, Y. & Mizukami, Y. 1999a. Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Applied Phycology* 11: 203-209.
- Kunimoto, M., Kito, H., Kaminishi, Y., Mizukami, Y. & Murase, N. 1999b. Molecular divergence of the SSU rRNA gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phyc.* 11: 211-216.
- Lambowitz, A. M. & Belfort M. 1993. Intron as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 587-622.
- Lindstrom, S.C. & Cole, K.M. 1992. The *Porphyra lanceolata*-*P. pseudolanceolata* (Bangiales, Rhodophyta) complex unmasked: recognition of new species based on isozymes, morphology, chromosomes, and distribution. *Phycologia* 31(5): 431-448.
- Lindstrom, S.C. & Cole, K.M. 1993. The systematics of *Porphyra*: Character evolution in closely related species. *Hidrobiologia* 260/261: 151-157.
- Lindstrom, S.C. & Fredericq, S. 2003. *rbcL* gene sequences reveal relationships among north-east Pacific species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) and a new species, *P. aestivalis*. *Phycological Research* 51: 211-224.
- Marston M. & Bohnsack M. V. 2002. Genetic variability and potential sources of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island waters (USA). 2002. *Journal of Phycology* 38: 649-658.
- Milstein, D. 2002. *Filogenia molecular de espécies de Porphyra (Bangiales, Rhodophyta) do Atlântico Sul*. Dissertação de Mestrado, Depto. de Botânica, IB-USP, pp. 82.
- Milstein D. & Oliveira M.C. 2005. Molecular phylogeny of Bangiales (Rhodophyta) based on small subunit rDNA sequencing: emphasis on Brazilian *Porphyra* species. *Phycologia* 44 (2): 212-221.
- Mizukami Y., Hitoshi K., Kunimoto M. & Kobayashi M. 1998. Effect of DNA preparation from laver (*Porphyra yezoensis*) thalli on reproducibility of RAPD (random amplified polymorphic DNA) patterns. *Journal of applied phycology* 10: 23-29.
- Müller, K.M., Sheath, R.G., Vis, M.L., Crease, T.J. & Cole, K.M. 1998. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the RuBisCo spacer, *rbcL* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. 1. North America. *Phycologia* 37: 195-207.
- Müller K.M, Cannone J.J., Gutell R.R. & Sheath R.G. 2001a. A Structural and Phylogenetic Analysis of the Group IC1 Introns in the Order Bangiales (Rhodophyta). *Molecular Biology and Evolution* 18: 1654-1667.

- Müller K.M., Oliveira M.C., Sheath R.G. & Bhattacharya D. 2001b. Ribosomal DNA phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the origin of secondary plastids. *American Journal of Botany* 88: 1390-1400.
- Müller K. M., Cole K. M. & Sheath R.G. 2003. Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in North America. II. Biogeographical trends in karyology: chromosome numbers and linkage with gene sequence phylogenetic trees. *Phycologia* 42 (3): 209-219.
- Neefus, C.D., Mathieson, A.C., Yarish, C., Klein, A., West A., Teasdale, B. & Hehre, E.J. 2000. Five cryptic species of *Porphyra* from the Northwest Atlantic. *Journal of Phycology* Suppl. 36(3):73.
- Nelson W. A., Broom J.E. & Farr T.J. 2001. Four new species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from the New Zealand region described using traditional characters and 18S rDNA sequence data. *Cryptogamie, Algologie* 22: 263-284.
- Nikoh, N. & Fukatsu, T. 2001. Evolutionary dynamics of multiple group I introns in the nuclear ribosomal RNA genes of the endoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Mol. Biol. Evol.* 18(9): 1631-1642.
- Niwa K., Kikuchi N. & Aruga Y. 2005. Morphological and molecular analyses of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 41: 294-304.
- Oliveira, E.C. & Coll, J. 1975. The genus *Porphyra* C. Ag. (Rhodophyta-Bangiales) in the American South Atlantic. I. Brazilian species. *Bot. Mar.* 18: 191-197.
- Oliveira, E.C. 1977. *Algas Marinhas Bentônicas do Brasil*. Tese de Livre Docência, IB-USP, pp.407.
- Oliveira, M.C. 1993. *Filogenia de Porphyra spp. (Rhodophyta): Sequenciamento do gene nuclear para o RNA da subunidade pequena do ribossomo (rDNA 18S) e estudos morfológicos da fase conchocelis*. Tese de Doutorado, Depto. Botânica, IB-USP, pp.160.
- Oliveira, M.C. & Ragan, M.A. 1994. Variant forms of a group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Mol. Biol. Evol.* 11:195-207.
- Oliveira M.C., Kurniawan J., Bird C.J., Rice E.L., Murphy C.A., Singh R.K., Gutell R.R. & Ragan M.A. 1995. A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiophycidae, Rhodophyta) based on sequences of the nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. *Phycological Research* 43: 71-79.
- Oliveira, M.C. & Bhattacharya, D. 2000. Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. *American Journal of Botany* 87(4): 482-492.
- Paula E.J. & Oliveira M.C. 1993. Ciclo de vida de *Porphyra* spp e ocorrência sazonal de suas fases na natureza. Livro de resumos da 6^o Reunião brasileira de ficologia, Tramandaí, RS, pp.110.
- Posada D. & Crandall K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-8.
- Ragan, M.A., Bird, C.J., Rice, E.L. & Singh, R.K. 1993. The nuclear 18S ribosomal RNA gene of the red algae *Hildenbrandia rubra* contains a group I intron. *Nucl. Acids Res.* 21: 3898.

- Ragan, M.A., Bird, C.J., Rice, E.L., Gutell, R.R., Murphy, C.A. & Singh, R.K. 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. *PNAS USA* 91: 7276-80.
- Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evolution* 4:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. 3 vol. Cold Spring Harbour Laboratories press, New York.
- Saunders G.W. & Hommersand M.H. 2004. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *Amer. Journ. Bot.* 91(10): 1494-1507.
- Sogin, M.L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In Innes, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, pp. 307-314.
- Sogin M.L. & Edman J.C. 1989. A self-splicing intron in the small subunit rRNA gene of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Research* 17: 5349-59.
- Stiller, J.W. & Waaland, J.R. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 29(4): 506-517.
- Swofford, D. L. 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-26.
- Teasdale B., Lindstrom S.C., Fredericq S., Neefus C.D., Mathieson A.C., Taylor H., West A.L., Mercado S.T., Piche N. & Klein A.S. 2000. Analysis of *Porphyra rbcL* demonstrates multiple migrations occurred between the North Atlantic and North Pacific. *Journal of Phycology* 36, supplement: 65.
- Teasdale B., West A., Taylor H. & Klein A. 2002. A simple restriction fragment length polymorphism (RLFP) assay to discriminate common *Porphyra* (Bangiothycidae, Rhodophyta) taxa from the Northwest Atlantic. *Journal of Applied Phycology* 14: 293-298.
- Van de Peer, Y., De Rijk, P., Wuyts, J., Winkelmanns, T. & De Wachter, R. 2000. The European Small Subunit Ribosomal database. *Nucleic Acid Res.* 28: 175-176.
- Yoneshigue, Y. 1985. *Taxonomie et Ecologie des Algues Marine dans la Region de Cabo Frio (RJ, Bresil)*. Thèse de Docteur d'Etat-Sciences, Univ. d'Aix-Marseille II. pp.454.
- Yoshida, T., Notoya, M., Kikuchi, N. & Miyata, M. 1997. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography. *Nat. Hist. Res.* Special Issue 3: 5-18.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 2002. Phylogeography of the *Bostrychia calliptera-B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41(1): 49-60.
- Zuccarello, G.C., Burger G., West, J. A. & King R. J. 1999b. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.

ANEXO 2.A

Alinhamento de seqüências

Seqüência da região do espaçador *rbcL*-S para *P. drewiana* (PD), *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (PSA), *P. spiralis* var. *spiralis* (PSS). A seqüência completa é dada apenas para *P. drewiana*. Posições idênticas são indicadas por pontos (.) Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As letras minúsculas indicam as seqüências dos “primers”. A posição de número 475 indicada por asterisco (*) localiza o final do gene *rbcL* e o início do espaçador, e a posição de número 553 indicada por asterisco (*) localiza o final do espaçador e o início do gene *rbcS*.


```

      10      20      30      40      50      60
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  ggtagctgttagtagtaaatwgaaggAGATCCTTTAATGATTAAAGGTTTCACAACACT
PSS  .....

      70      80      90      100     110     120
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  TTACTTGAAAGTGAAACAGACATTAATTTACCTCAAGGTTTATTCTTTGCTCAAAACTGG
PSS  .....

      130     140     150     160     170     180
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  GCATCTCTACGTAAAGTTGTTCCAGTAGCATCTGGTGGTATTTCATGCTGGTCAAAATGCAC
PSS  .....

      190     200     210     220     230     240
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  CAACTTCTTGATTATTTAGGTGATGATGTAGTTCTTCAATTTGGTGGTGGTACAATTGGA
PSS  .....

      250     260     270     280     290     300
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  CATCCGTGATGGTATCCAAGCGGGTGCAACTGCGAATAGAGTAGCATTTGGAGTCAATGGTT
PSS  .....

      310     320     330     340     350     360
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  ATGGCAAGAAATGAGGGTCGTAATTATGTAGCAGAAGGTCACAAATTTAAGAGACGCT
PSS  .....

      370     380     390     400     410     420
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  GCTAAAACTTGTTGACCTTTTACAAACAGCTTTTGACTTATGGAAAGACATTAGTTTTAAC
PSS  .....

      430     440     450     460     470     480
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  TATACTTCCACAGATACAGCTGATTTTGTGAGACTCCAACAGCAAACATCTAG*TTTAA
PSS  .....*.....*.....

      490     500     510     520     530     540
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  TGACTACTTGGCTAATGCTTAATTTAGCAAATTTGTGAGGAAAATTAACTTATAATAATAAG
PSS  .....

      550     560     570
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  GAGCATAGAANN*gtgagattaacacaagaac
PSS  .....NN*.....

```


ANEXO 2.B

Alinhamento de seqüências

Seqüência da região do espaçador *cox2-3* para *Porphyra drewiana* (PD), *P. spiralis* var. *amplifolia* (PSA) e *P. spiralis* var. *spiralis* (PSS). A seqüência completa é dada apenas para *P. drewiana*. Posições idênticas são indicadas por pontos (.). Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As letras minúsculas indicam as seqüências dos “primers”. A posição de número 198 indicada por asterisco (*) localiza o final do gene *cox2* e o início do espaçador e a posição de número 366 indicada por asterisco (*) localiza o final do espaçador e o início do gene *cox3*.


```

          10          20          30          40          50          60
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  gtaccwctctttdrgrkdaaatgtgaTGCTGTGCCAGGTAGATTAAATCAAAGTTCACCTT
PSS  .....

          70          80          90          100         110         120
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  TTTGTAAAACGTGAAGGCCTTTTTATGGCCAGTGCAGTGAAATTTGTGGCGTAAATCAT
PSS  .....

          130         140         150         160         170         180
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  GGCTTTATGCCATTGTTGTGAAGCTGTGTCTTTGCCAAGTTACATTTCTTGAATAGCT
PSS  .....

          190         200         210         220         230         240
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  AATAAGCTAAGTGAATA*ATAAAAAATTGGTTTGTCCACTAATATTTTATGCGTATATC
PSS  .....*

          250         260         270         280         290         300
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  TTTAACTCAAATATTTTTTTTAGCTTTTTTAGTCTTTTTTTTATTTTACTAAATCCAAA
PSS  .....

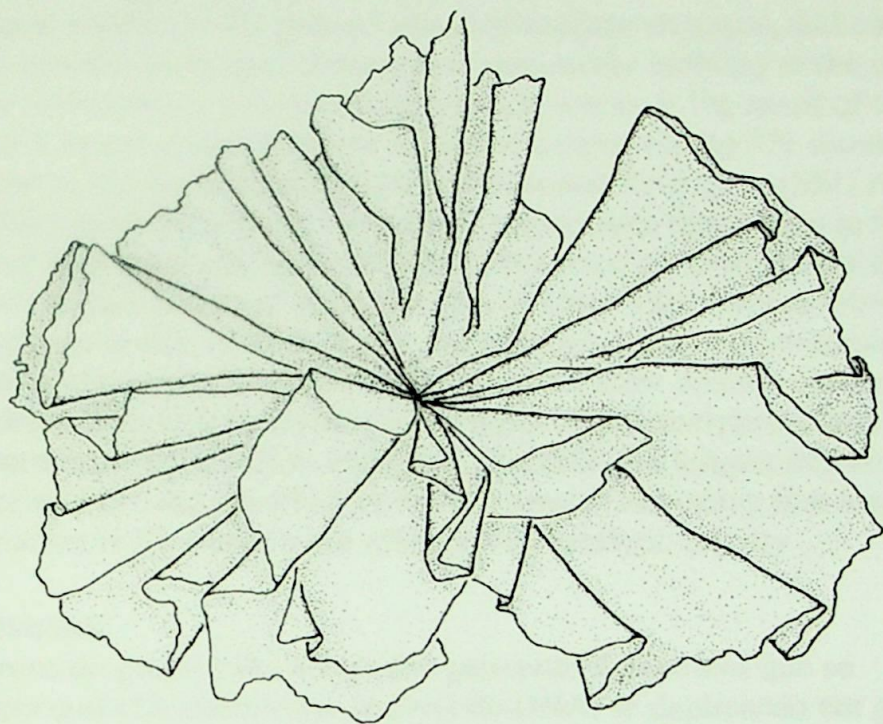
          310         320         330         340         350         360
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  ATATTTAACTTACACAATACGATTTTTTAAAAAATTGAAAAAGCGCTCAAAAATAAAAATG
PSS  .....

          370         380         390         400         410         420
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  AGCGTA*TAATTACAAACTATTATGACAAATACTACAAATTTAAGTTTTATAAAAAACAGC
PSS  .....*

          430         440         450
PD  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PSA  TAAACAATTGCAACgacatccwtttrcatctwgtagatcc
PSS  .....

```


Capítulo 3



**Caracterização de introns do grupo I em diferentes populações
de *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (Bangiales, Rhodophyta) das
costas sul e sudeste do Brasil**

Abstract

Group I introns are autonomous genetic elements that spread at the DNA level, duplicating themselves in intronless genes by a process called homing. Homing endonuclease genes (HEG) invades non-critical regions of the group I intron secondary structure, and codes for site-specific homing endonucleases that confer mobility to the intron. The maintenance of group I introns in genomes is the result of their ability to self-splice from the RNA transcripts. Group IC1 introns are found in the nuclear small subunit ribosomal RNA gene (SSU rDNA) of *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* populations that occurs in the South and Southeast coast of Brazil. We sequenced 40 introns from *PSA* isolates collected at eight different sites. Variations in intron length were detected occurring due to bases deletions in a homing endonuclease pseudogene located at the P1 stem domain. According to the introns length, five different types of polymorphisms were determined (from 616 to 1056 bp). The different lengths introns excised from the pre-RNA in *in vitro* assays, indicating that length variation in P1 stem do not affect intron catalytic activity.

Resumo

Introns do grupo I são elementos genéticos autônomos que se dispersam eficientemente no nível do DNA, se duplicando em genes sem intron por um processo chamado de "homing". Genes que codificam a endonuclease de "homing" (HEG) invadem regiões não críticas da estrutura secundária de intron do grupo I, promovendo a mobilidade do intron pela codificação de endonucleases de "homing" sítio-específicas. A manutenção dos introns do grupo I em genomas é o resultado da sua habilidade em se auto-excisar dos transcritos RNA. As populações de *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* que ocorrem nas costas sul e sudeste do litoral brasileiro apresentam introns do grupo IC1 inseridos no gene nuclear que codifica o rRNA da subunidade pequena do ribossomo (SSU rDNA). Foram seqüenciados 40 introns de isolados de *PSA*, coletados em oito localidades distintas. Foram detectadas variações no tamanho dos introns devido a deleção de bases de um pseudogene de endonuclease de "homing", localizado na hélice do domínio P1 do intron. De acordo com os tamanhos dos introns, que variaram de 616 a 1056 pb, foram caracterizados cinco diferentes tipos de polimorfismos. Os introns de diferentes tamanhos

se excisaram do pré-RNA, em ensaios *in vitro*, indicando que variações de tamanho na hélice P1 não impedem a atividade catalítica dos introns.

Introdução

Os introns do grupo I podem ser constituídos por dois domínios funcionalmente e estruturalmente distintos, que provavelmente evoluíram independentemente (Gimble 2000, Haugen *et al.* 2005): o gene que codifica endonuclease de “homing” (“homing endonuclease gene -HEG”) e a seqüência do centro catalítico altamente estruturado do intron (Bell-Pedersen *et al.* 1990, Lambowitz & Belfort 1993).

Os HEG são uma classe de elementos genéticos móveis, que têm sido considerados altamente invasores. Os HEG tiveram acesso aos genomas devido a sua habilidade em codificar endonucleases de “homing” (“homing endonuclease – HE”) que fazem a quebra da dupla hélice do DNA possibilitando a sua recombinação com o gene. A sua propagação é garantida quando esses elementos parasitários encontram refúgio em introns (Fig.3.1) que estabilizam a sua relação com o organismo hospedeiro, tornando-os invisíveis à seleção negativa pela inserção direta em um gene do hospedeiro (Belfort & Roberts 1997, Gimble 2000). Nos introns do grupo I, os HEGs ocorrem como extensões de seqüências em regiões periféricas de “loop” de hélices como P1, P2, P6, P8 e P9 (Turmel *et al.* 1995, Haugen *et al.* 1999).

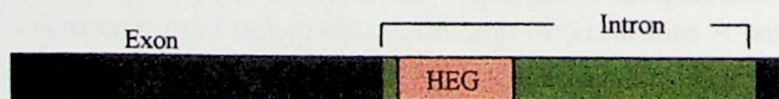


Figura 3.1. Organização do HEG inserido no intron que está inserido no exon.

A endonuclease codificada pelo HEG quando expressa, inicia o mecanismo que promove a sua mobilidade e a mobilidade do intron associado (“homing”), se espalhando rapidamente em uma população (Bhattacharya *et al.* 2005). As HEs são responsáveis pelo reconhecimento do local no qual o intron se insere, e pela clivagem da dupla fita em um sítio específico do gene sem intron, resultando na

conversão do intron e na co-conversão dos exons (Dujon 1989, Belfort & Roberts 1997).

As endonucleases de “homing” são divididas em quatro famílias, classificadas de acordo com motivos protéicos conservados e propriedades funcionais e estruturais. São elas: LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H e His-Cys box (Belfort & Perlman 1995, Belfort & Roberts 1997, Chevalier & Stoddard 2001). O motivo protéico His-Cys box contém duas histidinas e três cisteínas conservadas em um segmento de 30 aminoácidos (Belfort & Perlman 1995, Belfort & Roberts 1997) e é identificado em HE exclusivamente associada aos introns nucleares do grupo I (Johansen *et al.* 1993). A distribuição das HEs nos introns sugere origens independentes entre os HEGs e os introns (Gimble 2000, Haugen *et al.* 2005).

Foram caracterizadas ORFs contendo o motivo His-Cys box na fita complementar àquela que codifica o SSU rRNA e os introns do grupo I de *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (Oliveira & Ragan 1994, Haugen *et al.* 1999).

Introns do grupo I são elementos genéticos móveis que catalisam a sua própria remoção do pré-RNA (auto-processamento) para gerar o RNA maduro. O auto-processamento dos introns do grupo I pode ocorrer na forma direta e reversa (auto-processamento reverso) através de duas reações de transesterificação consecutivas, sem gasto de energia (Fig. 3.2). No caso do auto-processamento, o resultado é remoção do intron e a junção dos exons, e no caso do processamento reverso, o resultado é a inserção do intron interrompendo os genes em exons (Cech & Bass 1986; Cech 1988, 1990; Woodson & Cech 1989). Além do auto-processamento, os introns do grupo I podem catalisar uma terceira reação de transesterificação que promove a circularização do intron (Zaug *et al.* 1983). Devido a estas propriedades catalíticas os introns do grupo I são também chamados de ribozimas.

As reações de auto-processamento dos introns do grupo I requerem um cátion monovalente, um cátion divalente (Mg^{2+}) e um cofator exógeno de guanosina 3'-OH livre (G), ou uma de suas formas fosforiladas (GMP, GDP ou GTP). A guanosina deve se ligar a um sítio no centro catalítico do intron, chamado de sítio de ligação a G ou “G-binding site” (Cech 2002, Westhof 2002).

Estruturalmente os sítios de processamento devem ficar alinhados e próximos o suficiente para a excisão do intron e a ligação dos exons.

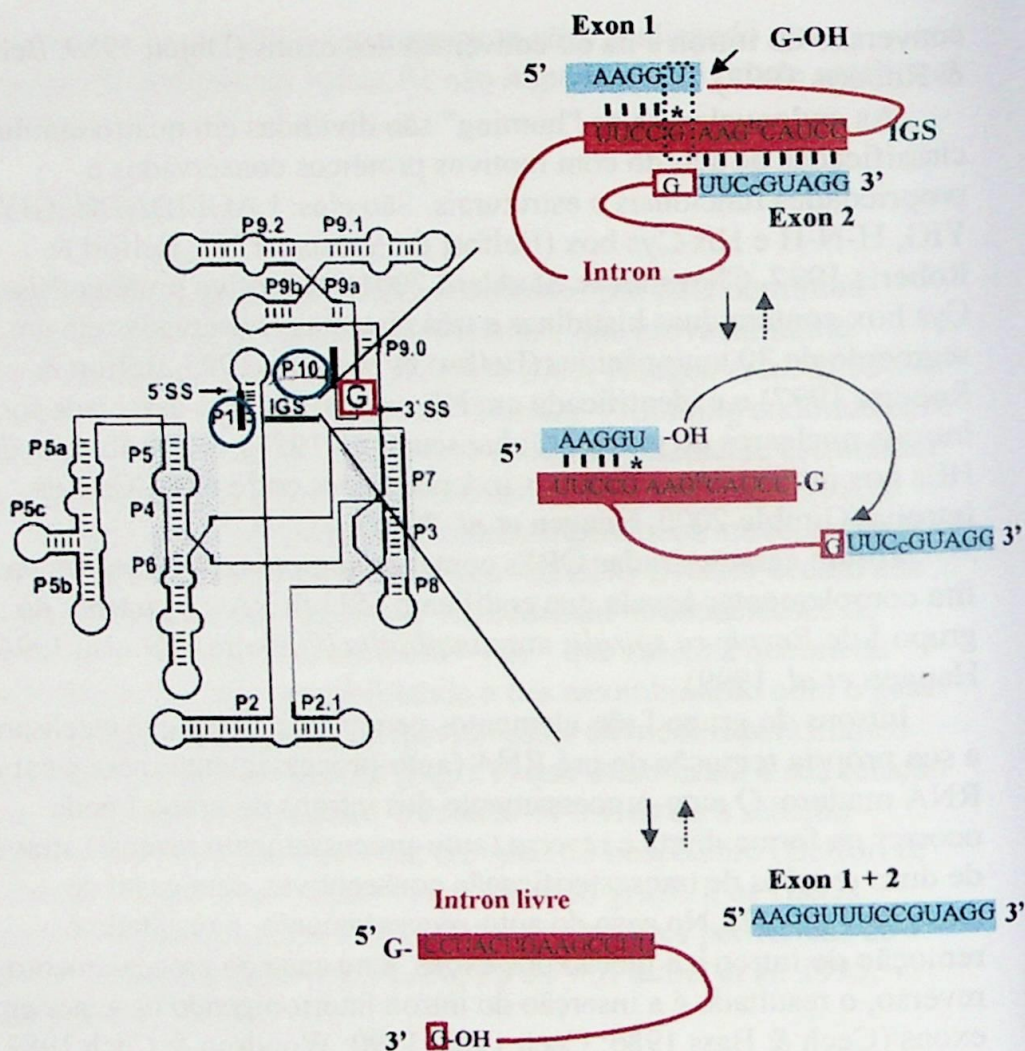


Figura 3.2. À esquerda está o esquema da estrutura secundária de um intron do grupo I, evidenciando as regiões de pareamento (P1, P10 e IGS) necessárias para o auto-processamento. O G destacado em vermelho indica a guanósina que precede o sítio de “splicing” 3’ do intron. As regiões destacadas em cinza indicam o núcleo catalítico do intron. À direita está desenhado o esquema da reação de auto-processamento (↑) e auto-processamento reverso (↓) do intron do grupo I. Intron - destacado em vermelho, exon - destacado em azul, G-OH - Guanósina livre destacada em roxo, pareamento U*G pontilhado - Uracila que precede o sítio de “splicing” 5’ e a G que pareia com a U no IGS. IGS- seqüência interna guia. Modificado de Bhattacharya *et al.* (2005).

Alguns pareamentos estão diretamente envolvidos na aproximação dos sítios de processamento, em uma conformação que favorece a reação enzimática. O intron reconhece na extremidade 3' do exon 1 uma região com 4 a 7 nucleotídeos, na qual ele pareia, formando a hélice P1. Essa região do intron que pareia com o exon é chamada de seqüência guia interna (“internal guide sequence” – IGS) que embora não seja conservada em nucleotídeos, é conservada estruturalmente entre os introns do grupo I (Davies *et al.* 1982, Lambowitz 1989). O IGS também pareia com o exon 2 formando a hélice P10 (Fig. 3.2).

A reação de auto-processamento é iniciada pela ligação da guanosina livre (G-OH) no sítio de ligação a G, seguido pelo ataque do grupo OH-3' da G-livre ao sítio de processamento 5' do intron. Isso gera a quebra da ligação covalente entre o exon 1 e o intron, e promove a ligação covalente entre a G-livre e o sítio 5' do intron, resultando na liberação do exon 1. Mesmo após ter sido clivado do intron, o exon 1 permanece ligado ao IGS via pareamento P1, deixando o exon 1 pronto para o segundo passo do auto-processamento. A G-livre é removida do sítio de ligação a G, e é repostada pelo último nucleotídeo do intron, que é sempre uma guanosina. A ligação dos exons ocorre quando o OH livre do exon 1 ataca a guanosina 3' do intron, resultando na liberação da guanosina, conseqüentemente na liberação do intron e junção dos exons (Cech 1990, Cech & Herschlag 1996, Adams *et al.* 2004a, 2004b).

Os nucleotídeos conhecidos por serem altamente conservados entre introns do grupo I, são: a U (Uracila) que precede o sítio de “splicing” 5' e a G que pareia com a U no IGS (Fig. 3.2, tracejado), o par de bases G*C na hélice P3 (não indicado na Fig. 3.2) e o último nucleotídeo do intron, a G (Fig. 3.2 quadrado vermelho) que precede o sítio de “splicing” 3' do intron (Cech 1988). O pareamento U*G é um importante elemento de reconhecimento, que define o sítio exato do ataque da Guanosina (Cech 1988, 1990). Além desses, a maioria dos nucleotídeos conservados entre os diferentes introns do grupo I encontra-se nos elementos P, Q, R, S, localizados nas hélices P3, P4, P6 e P7 respectivamente (Fig 3.2. cor cinza) que formam o núcleo catalítico dos introns do grupo I (Michel & Westhof 1990).

Porphyra spiralis var. *amplifolia* (PSA) apresenta um intron do grupo I inserido próximo à extremidade 3' do gene SSU rRNA, na posição 1506 (S1506). Foram encontrados introns com mesma seqüência,

porém de tamanhos diferentes ocorrendo em três isolados de diferentes populações coletadas na costa sudeste do Brasil (Oliveira & Ragan 1994). Neste trabalho foram seqüenciados 40 introns que ocorrem no SSU rDNA de *PSA*, coletadas em oito localidades do litoral sul e sudeste do Brasil, para verificar sua distribuição e ocorrência de variantes de tamanho. Os introns de diferentes tamanhos foram testados para o auto-processamento *in vitro*.

Material e Métodos

1. Obtenção das amostras de *Porphyra*

Isolados de *PSA* foram coletados em oito locais das costas sul e sudeste do litoral brasileiro (Tabela 3.1). Para cada local foram coletados no mínimo doze isolados. Os talos gametofíticos foram identificados de acordo com a descrição morfológica em Oliveira & Coll (1975). Com o auxílio da lupa, o material foi limpo e triado para remoção de epífitas e posteriormente preservado em sílica gel. Exemplares de cada população foram depositados no Herbário Ficológico (SPF) do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Tabela 3.1. Informação de coleta para as populações de *P. spiralis* var. *amplifolia*.

População	Local de Coleta	Coletor	Data	Voucher
<i>PSA-A</i> ¹	Ponta da Armação, Florianópolis, SC	E.C. Oliveira	Nov 1997	SPF 5618
<i>PSA-B</i> ²	Fortaleza, Ubatuba, SP	M.C. Oliveira	Out 1990	-
<i>PSA-C</i> ¹	Baleia, São Sebastião, SP	D. Milstein	Ago 2002	SPF 5618
<i>PSA-D</i> ²	Cebimar, São Sebastião, SP	M.C. Oliveira	Out 1990	-
<i>PSA-G</i> ¹	Tijucopava, Guarujá, SP	D. Milstein	Jul 2002	SPF 5618
<i>PSA-I</i> ¹	Cibratel, Itanhaém, SP	M.C. Oliveira	Ago 1997	SPF 5618
<i>PSA-L</i> ¹	Lagoinha, Florianópolis, SC	E.C. Oliveira	Nov 1997	SPF 5618
<i>PSA-R</i> ²	Ilha do Cardoso, SP	E. J. Paula	Ago 1989	-
<i>PSA-S</i> ¹	Forte Itaipu, Santos, SP	E.C. Oliveira	Ago 1997	SPF 5618
<i>PSA-T</i> ¹	Tombo, Guarujá, SP	D. Milstein	Jul 2002	SPF 5618
<i>PSA-V</i> ¹	Vermelha do Norte, Ubatuba, SP	M.C. Oliveira	Ago 1998	SPF 5619

Isolados coletados: ¹ neste trabalho, ² Oliveira & Ragan (1994)

2. Extração de DNA

As algas foram maceradas em nitrogênio líquido para a lise de tecidos e células. A extração de DNA foi feita com o “kit” de extração “Dneasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Santa Clarita, EUA), de acordo com o protocolo do fornecedor. Após a extração, o DNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989) para averiguação da qualidade e quantidade de DNA extraído.

3. Amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Os “primers” 1400F e 18S3’ (Tab. 3.2) foram utilizados para a amplificação do intron que ocorre em *PSA*. As condições de amplificação para um volume final de 50 μ L foram: 1X tampão de PCR, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 μ M de cada “primer”, aproximadamente 2 ng de DNA e 1.25u de *Taq* DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, EUA). Todas as PCR foram feitas na termocicladora MiniCycler (MJ Research, Watertown, EUA). O ciclo da PCR usado na amplificação do intron foi: 94°C por 4 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min; e a extensão final a 72°C por 7 min.

Após a reação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989) para checagem do tamanho e quantidade de DNA amplificado. Para garantir a pureza dos reagentes nas PCR, foram feitos controles negativos com todos os reagentes menos o DNA. Para minimizar eventuais erros de incorporação de bases durante a PCR, no mínimo três reações independentes foram reunidas antes do material ser seqüenciado (Baldwin *et al.* 1995). Os produtos da PCR foram purificados em colunas MicroSpin™ S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA) e foram diretamente seqüenciados.

4. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi feito com aproximadamente 40 ng de produto de PCR purificado, 3.2 pmol de “primer” e o “kit” de seqüenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os “primers” que foram utilizados estão listados na Tabela 3.2. As reações de

amplificação foram feitas na termocicladora MiniCycler (MJ Research), com 40 ciclos a 96°C por 10 seg, 54°C por 20 seg e 60°C por 4 min. Os produtos da PCR contendo os ddNTPs marcados foram precipitados em isopropanol 75% e lavados em etanol 70%. As amostras foram seqüenciadas nos seqüenciadores automáticos ABI PRISM™ 310 ou ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabela 3.2. “Primers” usados para amplificação e seqüenciamento do intron. “Primers” obtidos ou modificados de: (a) Sogin 1990 (b) Oliveira & Ragan 1994.

“Primers”	Seqüências	Posição em <i>PSA</i>
1400F (b)	5'-TGTACACACCGCCCGTC-3'	SSU rDNA, 1659
iF-1 (b)	5'-ACAAGGTTTCCGAAAGGG-3'	Intron, 1798
iR-3 (b)	5'-TTAATGTCGTGACCGCGCA-3'	Intron, 2306
iF-2 (b)	5'-AAGTCGCTTTTGTGGC-3'	Intron, 2382
iR-2 (b)	5'-TTCGGACTGACTGCGTCG-3'	Intron, 2461
iF-3 (b)	5'-CGCTGGATGGTAATAAGGTG-3'	Intron, 2580
iR-1 (b)	5'-GACTCTGCTTTCGCAG-3'	Intron, 2730
18S3' (a)	5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA-3'	SSU rDNA, 2860
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Vetor

As seqüências obtidas nas direções direta e reversa foram manualmente alinhadas no programa ESEE 3.2 (Cabot & Beckenbach 1989) para a geração de uma seqüência consenso para cada amostra. Quando houve divergência entre nucleotídeos das diferentes seqüências obtidas para uma a mesma posição em um indivíduo, os cromatogramas das seqüências foram analisados para confirmar os resultados. As seqüências consenso foram identificadas por comparação com seqüências disponíveis no GenBank através do programa BLASTN (Altschul *et al.* 1990).

5. Clonagem

5.1. PCR

Os introns dos isolados *PSA-G4*, *PSA-L8*, *PSA-T10* e *PSA-V3* foram amplificados por PCR com os “primers” 1400F e 18S3' (Tabela 3.2), quantificados e purificados (item 3), para serem clonados no vetor pGEM[®]-T (Promega Corporation, Madison, EUA). O vetor pGEM[®]-T linearizado com a enzima *EcoR* V tem nas suas extremidades 3' timidinas livres. A enzima *Taq* polimerase utilizada nas PCR, adiciona uma deoxiadenosina livre nas extremidades 3' dos

fragmentos amplificados. A ocorrência de duas extremidades coesivas complementares aumenta consideravelmente a eficiência da ligação do vetor com o produto da PCR.

5.2. Reação de ligação

As reações de ligação foram feitas com os produtos da PCR (aproximadamente 50ng) e com o vetor pGEM[®]-T (aproximadamente 50ng) em presença da enzima T4 DNA Ligase, de acordo com o protocolo do fornecedor. Foram feitos também controles negativo (reação sem produto da PCR) e positivo (reação com inserto de DNA controle). Para aumentar o número de colônias após a transformação, as reações de ligação ficaram incubadas a 4°C durante 12 hs.

5.3. Transformação

Após a reação de ligação, os vetores (plasmídeos) contendo os insertos foram inoculados nas bactérias competentes: 2µL de cada reação de ligação foram adicionados a 50 µL de células competentes e incubados no gelo por 20 min. Imediatamente após o choque térmico a 42°C por 50 segundos, a reação foi incubada novamente no gelo por 2 min. Foram adicionados à reação 950µL de meio Luria-Bertani (LB para 1L: 10g Bacto-triptona, 5g Bacto-extrato de levedura, 5g de NaCl, 15g de agar e 100µg/mL de ampicilina) que então foi incubada durante 1 hora e 30 min no agitador a 37°C. Foram plaqueados 100µL de cada transformação em placas duplicadas, contendo 25 mL de LB com ampicilina (100µg/mL), IPTG (0.5mM) e X-Gal (80µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

5.3.1 Bactérias competentes

As bactérias (DH10B) foram colocadas para crescer em 2 mL de meio de cultura LB por 2 hs a 37°C (sob agitação). Quando o meio ficou turvo, foi adicionado mais 50 mL de meio LB. Após incubação de 2 hs, foi adicionado 500 µL de MgCl₂ (1M), a cultura foi mantida no gelo por 15 min e centrifugada à 3000 rpm por 17 min à 4°C. As células foram ressuspendidas em 15 mL de RFI (30mM KAc, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂ e 15% glicerol) e os tubos foram mantidos no gelo por 10 min. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas à 3000 rpm por 17 min à 4°C, ressuspendidas em 2 mL de RFI (10mM Na-MOPS (pH 7,0), 75mM

CaCl₂, 10mM KCl e 15% glicerol) e mantidas à -80°C até serem utilizadas.

5.4. Mini-preparação de plasmídeos (“minipreps”)

Após o crescimento das colônias de bactérias nas placas, foi possível observar dois tipos de colônias por diferenciação de cor. As colônias azuis são as que não contêm o inserto em seus plasmídeos e as colônias brancas são as que contêm o inserto. Cinco colônias brancas foram selecionadas por placa e foram repicadas em 2mL de meio LB líquido cada. As colônias ficaram incubadas no meio líquido por 16 horas a 37°C no agitador.

Após o crescimento, 500µL de cultura para cada clone foram armazenados em 500µL de glicerol e congelados a -70°C. O DNA dos plasmídeos foi isolado e purificado com o kit Wizard[®] plus SV minipreps DNA purification system (Promega) conforme o protocolo do fornecedor, a partir do restante da cultura de bactérias. Após a purificação, foi feito um gel de agarose (0,7%) para a quantificação do DNA do plasmídeo.

5.5. Seqüenciamento

Os vetores com o inserto foram seqüenciados com 10 pmol de “primer” T7 (item 4), para verificar a direção do inserto. Para os experimentos seguintes foram utilizados apenas os vetores em que o inserto se ligou na direção direta, a partir do “primer” T7.

6. Digestão dos plasmídeos e PCR

Geralmente, o DNA molde é linearizado antes da transcrição *in vitro*, para que os transcritos sejam de tamanhos definidos. Os plasmídeos foram então digeridos, com a enzima de restrição *SalI* à 37° C por 2 horas, conforme protocolo do fornecedor (Invitrogen, Gaithersburg, EUA). Após a digestão, foi feito um gel de agarose 0,7% para verificar se o plasmídeo foi totalmente linearizado. Posteriormente, o plasmídeo foi purificado por extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com etanol 95%.

Simultaneamente, foi feita PCR utilizando o DNA do plasmídeo como molde, com os “primers” T7 e 18S3’ (Tabela 3.2). A PCR promove o mesmo efeito da linearização por digestão, e é um método

mais rápido e prático. Então, o material proveniente da digestão foi armazenado enquanto que o material derivado da PCR foi utilizado para dar continuidade aos experimentos. Os produtos da PCR foram purificados com o kit Wizard[®] SV Gel and PCR clean up system (Promega) de acordo com o protocolo do fornecedor, e quantificados em gel de agarose 0,7%.

7. Transcrição *in vitro*

Foi submetido à transcrição *in vitro* 1 µg do produto da PCR. As reações de transcrição foram feitas em presença da enzima T7 RNA polimerase, que acompanha o “kit” T7 RiboMAX[™] Express large scale RNA production system (Promega) conforme protocolo do fornecedor. As amostras foram incubadas por 45 min à 45°C. Logo após a transcrição o DNA molde foi digerido com RQ1 RNase-free DNase (Promega), o RNA foi purificado com fenol (pH 4.7):clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1), precipitado com etanol 95% e eluído em H₂O miliquê conforme protocolo do fornecedor. O transcrito foi armazenado à -70°C.

8. Reação de auto-processamento (“self-splicing”) *in vitro*

Para verificar se as diferentes variantes de tamanho do intron se excisam *in vitro* em diferentes condições, uma alíquota de cada material transcrito foi incubada por 45 min à 45°C, em presença do tampão de auto-processamento: 100mM (NH₄)₂ SO₄, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 60mM MgCl₂ e 0,2mM GTP (Sogin & Edman 1989), e outra alíquota foi incubada por 45 min à 45°C apenas na H₂O miliquê em que o RNA foi eluído. Ambos os materiais foram purificados por extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitados em etanol 95%.

9. Gel de Agarose para visualização e quantificação de RNA

Conforme o protocolo do fornecedor, bons resultados podem ser obtidos em géis não desnaturantes, desde que a amostra de RNA seja desnaturada em um tampão antes de ser carregada no gel. Para verificar se ocorreu o auto-processamento do intron *in vitro*, foi feito um gel de agarose 2% em tampão TAE (1X) corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989). De acordo com o protocolo do

fornecedor, 2 μ L de RNA foram desnaturados por 10 min a 70°C em 18 μ L de tampão desnaturante (10mL de formamida deionizada, 3.5mL de formaldeído 37% e 2mL de tampão MOPS), com 2 μ L de tampão de carregamento (50% glicerol, 1mM EDTA, 0,4% azul de bromofenol, 1mg/ml EtBr).

10. RT-PCR (Transcrição reversa pelo método da PCR)

O RNA transcrito que foi incubado por 45 min à 45°C (reação de auto-processamento controle) foi diluído em 1:10 em H₂O miliquê e foi submetido à transcrição reversa com os “primers” 1400F e 18S3’, nas seguintes condições de amplificação: 1X tampão AccessQuickTM Master Mix (Promega), 0.2 μ M de cada “primer”, aproximadamente 1 ng de RNA e 5U de transcriptase reversa AMV (Promega) para um volume final de 50 μ L. Inicialmente, as reações foram incubadas por 45 min a 45°C para a síntese de cDNA (transcrição reversa), seguidas pelo ciclo de PCR: 95°C por 2 min; 40 ciclos a 95°C por 30 seg e 60°C por 30 seg; com extensão final a 72°C por 5 min. Como o produto a ser amplificado tinha tamanho aproximado de 200 pb, o passo de extensão foi excluído dos 40 ciclos, conforme sugerido pelo protocolo do fabricante. Todas as PCR foram feitas na termocicladora MiniCycler (MJ Research).

11. PCR

A banda de interesse foi cortada do gel com uma gilete, sob luz ultravioleta, e posteriormente foi purificada com o kit Wizard[®] SV Gel and PCR clean up system (Promega) conforme o protocolo do fornecedor. Essa banda foi reamplificada com os “primers” 1400F e 18S3’ nas condições descritas no item 3. O ciclo utilizado foi: 95°C por 2 min; 40 ciclos a 95°C por 30 seg e 60°C por 30 seg; com extensão final a 72°C por 5 min, conforme descrito para RT-PCR. Os produtos da PCR foram purificados com o kit Wizard[®] SV Gel and PCR clean up system (Promega) e foram diretamente seqüenciados conforme descrito no item 4.

Resultados

Os introns S1506 dos isolados de *PSA* provenientes de oito populações diferentes (Tab.3.1) foram amplificados por PCR (dez isolados por população). De acordo com os resultados das PCR, visualizados em gel de agarose, foi possível observar que o tamanho dos introns variou entre algumas populações, apresentando o menor tamanho para os isolados da população *PSA-V* e o maior tamanho para os isolados das populações *PSA-A*, *PSA-I*, *PSA-L* e *PSA-T* (Tabela 3.3). Não foram observados polimorfismos para os tamanhos dos introns no nível intra-populacional, exceto para as populações *PSA-S* e *PSA-T*.

Foram seqüenciados os introns S1506 dos dez isolados das populações *PSA-S*, *PSA-T* e *PSA-V* e de dois isolados das demais populações. Dados de seqüenciamento dos isolados *PSA-B*, *PSA-D* e *PSA-R* foram obtidos de Oliveira & Ragan (1994). Foram identificados cinco tipos de polimorfismos de tamanho para o intron S1506, em um total de oito populações de *PSA* analisadas e mais os três isolados seqüenciados por Oliveira & Ragan (1994), conforme especificado na Tabela 3.3. Os polimorfismos de tamanho foram nomeados de acordo com o tamanho do intron, começando pelo Tipo 1 para o intron de menor tamanho (616 pb) até Tipo 5 para o intron de maior tamanho (1056 pb). A presença de dois introns de tamanhos diferentes ocorrendo em um único isolado foi observada para um isolado da população *PSA-S*, S2-I e S2-II e para um isolado da população *PSA-T*, T5-I e T5-II. Os polimorfismos para o tamanho dos introns S1506 de *PSA* ocorrem devido a inserções/deleções (indel) de diferentes tamanhos (variam de 42 a 482 pb) na hélice P1. A essa região foi dado o nome de extensão P1 (Figura 3.3).

Figura 3.3. Esquema da estrutura secundária do intron do grupo I S1506 de *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (modificado de Haugen *et al.* 1999). Nucleotídeos e "loop" destacados em azul delimitam a região da extensão P1 (extP1). Os números destacados em azul indicam a variação de tamanho em número de nucleotídeo que ocorre para cada alelo nesta região. Nucleotídeos do exon do SSU rDNA estão em letras minúsculas e do intron em letras maiúsculas. O par conservado u*G está em letras vermelhas. O número de nucleotídeos dos "loops" maiores está destacado em verde. As caixas laranjas são as posições onde foram verificadas as substituições nos diferentes alelos, nas regiões conservadas dos introns (Hélices P1-P10, excluindo-se a extP1).

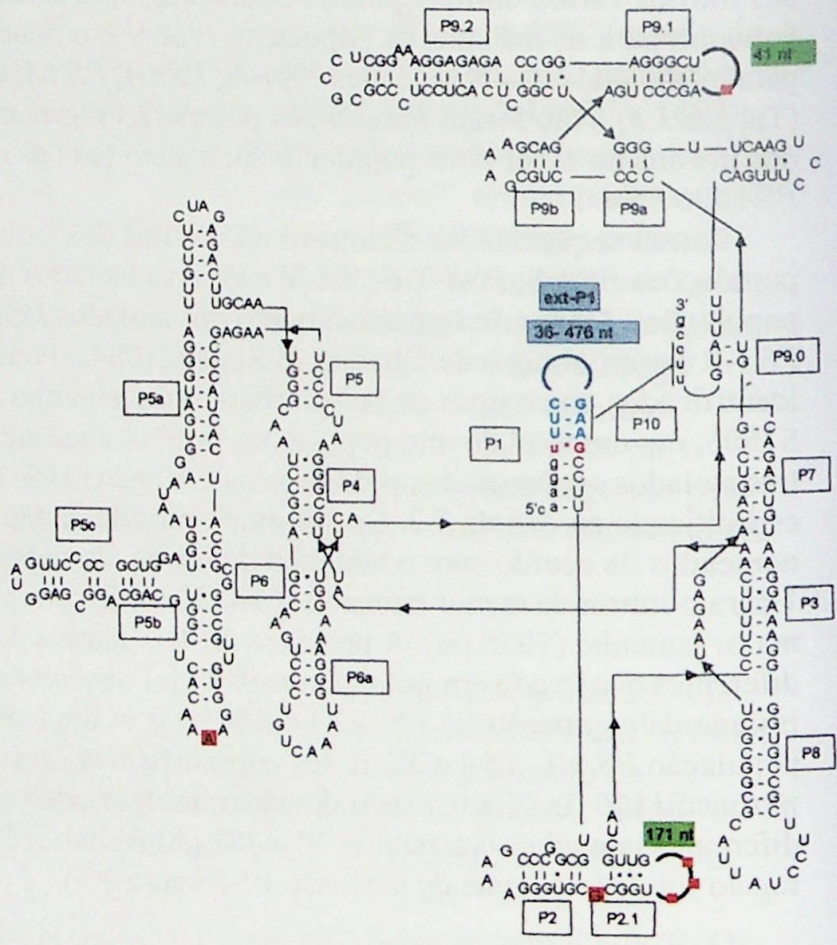


Tabela 3.3. Polimorfismo de tamanho do intron S1506 encontrado nas diferentes populações de *P. spiralis* var. *amplifolia* (PSA). X + Y – ocorrência de introns de tamanhos diferentes no mesmo isolado.

População	Polimorfismo	Tamanho do Intron	Tamanho da extensão P1	Local de Coleta
PSA-V	Tipo 1	616 pb	42 pb	Ubatuba, SP
PSA-B	Tipo 2	744 pb ¹	170 pb ²	Ubatuba, SP
PSA-C	Tipo 3	791 pb	217 pb	São Sebastião, SP
PSA-G	Tipo 3	792 pb	218 pb	Guarujá, SP
PSA-D	Tipo 4	909 pb ¹	334 pb	São Sebastião, SP
PSA-R	Tipo 5	1055 pb ¹	482 pb ²	Ilha do Cardoso, SP
PSA-A	Tipo 5	1056 pb	482 pb	Florianópolis, SC
PSA-L	Tipo 5	1055 pb	481 pb	Florianópolis, SC
PSA-I	Tipo 5	1056 pb	482 pb	Itanhaém, SP
PSA-S	Tipo 3	792 pb	218 pb	Santos, SP
	Tipo 4	909 pb	335 pb	
	Tipo 3+4	792 + 909 pb	218+335 pb	
	Tipo 3	792 pb	218 pb	
PSA-T	Tipo 4	909 pb	335 pb	Guarujá, SP
	Tipo 5	1055 pb	481 pb	
	Tipo 3+5	792 + 1055 pb	218+481 pb	

Dados obtidos de: ¹ Oliveira & Ragan (1994), ² Haugen *et al.* (1999)

Os limites adotados para a extensão P1 foram descritos por Haugen *et al.* (1999). A extensão P1 que ocorre nas populações de PSA está confinada pelo pareamento conservado U*G, entre o exon do SSU rDNA e o intron respectivamente (Fig.3.2). No alinhamento disponível no anexo 3.A, é possível visualizar o tamanho e os locais de inserção da extensão P1 dos diferentes polimorfismos de tamanho.

Dentre os cinco tipos de polimorfismos de tamanho foi possível estabelecer 17 diferentes alelos (H), baseados na variabilidade entre as seqüências dos isolados (Tabela 3.4 e Anexo 3.A). A região mais variável entre os 17 alelos ocorre na extensão P1. A identidade entre as regiões conservadas dos diferentes alelos (isto é, sem a extensão P1, começando a partir da G do pareamento U*G) foi de 99.5% a 100%. Os alelos H1 a H5; H7 a H11; H13 e H17 são 100% idênticos nessa região (representados pelo alelo H1 no Anexo 3B).

Tabela 3.4. Os 17 alelos estabelecidos a partir de substituições e “indels” entre as seqüências de 43 introns e suas respectivas ORF na região P1. Os números que sucedem as abreviaturas das populações se referem aos isolados seqüenciados. H-alelo, Tp- tipo, aa-aminoácidos, f/s –“frame shift”, pos – posição no alinhamento de nucleotídeos (Anexo A). O número entre parêntesis indica quantos “frame shifts” são necessário para a ocorrência do motivo His-Cys box e em qual posição ele ocorre.

Isolados de PSA	Alelos	ORF	Motivo His-Cys box
A3, A10	H1 – Tp 5	1 (137 aa)	Sim, f/s (-2), pos. 4
I2	H2 – Tp 5	2 (138 aa)	Sim
R ^{1,2}	H3 – Tp 5	1 (137 aa)	Sim, f/s (-1), pos. 38 ⁵
L3	H4 – Tp 5	1 (137 aa)	Sim
I5, L8, T5-II, T6	H5 – Tp 5	1 (137 aa)	Sim
D ¹	H6 – Tp 4	3 (87 aa)	Sim, f/s (-1), pos. 49
T10, S3	H7 – Tp 4	4 (88 aa)	Sim, f/s (-1), pos. 49
C6, C7	H8 – Tp 3	5 (49 aa)	Não
G4	H9 – Tp 3	6 (61 aa)	Não
G7, S1, S2-I, S4, S6-S9, T3, T4, T7	H10 – Tp 3	6 (61 aa)	Não
T1, T2, T5-I, T8, T9	H11 – Tp 3	7 (61 aa)	Não
S5	H12 – Tp 3	6 (61 aa)	Não
S10	H13 – Tp 3	5 (49 aa)	Não
B ¹	H14 – Tp 2	8 (45 aa)	Não
V3	H15 – Tp 1	9 (10 aa)	Não
V8	H16 – Tp 1	9 (10 aa)	Não
V1, V2, V4-V7, V9, V10	H17 – Tp 1	9 (10 aa)	Não

Dados obtidos de: ¹ Oliveira & Ragan (1994), ² Haugen *et al.* (1999)

A região P1 dos diferentes alelos foi traduzida em proteínas no programa ESEE 3.2 (Cabot & Beckenbach 1989) com os seguintes resultados: Dos 17 alelos de DNA, foram geradas nove ORF distintas, que foram comparadas com outras seqüências de proteínas disponíveis no GenBank com o programa BLASTP (Altschul *et al.* 1990). Das nove ORF, três apresentaram a seqüência intacta do motivo His-Cys box (29 aminoácidos) sem truncamento, quatro apresentaram o motivo inserindo “frameshifts” manualmente, e as demais não tem motivo His-Cys box nem apresentaram similaridade com outra proteína disponível no banco de dados (Tabela 3.4). As ORF estão alinhadas no Anexo 3.C.

Os alelos que apresentaram o motivo His-Cys box, apresentaram também os domínios associados ao sítio de ligação de zinco, caracterizado para a endonuclease I-PpoI (Flick *et al.* 1998). Todas as ORF apresentaram o códon de início ATG. No entanto, códons de

parada ocorrendo prematuramente quando comparados aos da I-*PpoI* e ocorrência de truncamentos sugerem que essas ORF são HEG não funcionais.

Os introns S1506 de *PSA* foram classificados por Oliveira e Ragan (1994) como pertencente ao sub-grupo IC1, assim como foram classificados os introns das populações analisadas neste trabalho, baseado em características da sua estrutura primária e secundária (Michel & Westhof 1990).

Todos os introns estão inseridos próximo à extremidade 3' do SSU rDNA, entre os motivos CAAGGU e UUCCG. O motivo UUCCG aparece duplicado quando os introns S1506 estão inseridos no gene, pois uma cópia ocorre no SSU rDNA e a outra no intron (posição 1-5; Anexo 3.A)¹. O motivo GCCUU (489-493) aparece como duplicação inversa do motivo UUCCG (1-5) em todos os introns. A guanosina do motivo GCCUU (489-493) parecia com a U do exon 5' para formar o sítio de reconhecimento para o auto-processamento. Na extensão P1 de todas as populações de *PSA* o motivo AUGCUU está duplicado (posições 55-60 e 366-371), exceto em *PSA-V* (não ocorre) e em *PSA-B* onde ocorre em cópia única. A região de "indel" de *PSA-B*, em relação aos introns mais longos, se inicia logo após o motivo AUGCUU (55-60) e termina logo após o motivo AUGCUU (366-371).

Para verificar se ocorre o auto-processamento dos introns nas suas diferentes variantes de tamanho, quatro isolados com alelos do tipo 1 (*PSA-V3*)², tipo 3 (*PSA-G4*), tipo 4 (*PSA-T10*) e tipo 5 (*PSA-L8*) dos introns S1506 e exons flanqueadores foram clonados para transcrição *in vitro*. Os produtos transcritos (pré-RNA) dos quatro isolados foram testados para o auto-processamento em duas condições: **Reação 1.** O pré-RNA dos isolados foi incubado em um tampão que favorece a excisão do intron (item 8, Material & Métodos) por 45 min à 45°C (Resultados nas Figs. 3.4 e 3.5), **Reação 2.** uma reação de auto-processamento controle com apenas o material transcrito, purificado em H₂O miliquê foi também incubada por 45 min à 45°C. O experimento controle revelou um resultado similar ao

¹ O número entre parêntesis se refere à posição do motivo no alinhamento do intron no anexo A.

² Os números que sucedem os nomes das populações se referem aos isolados selecionados

do experimento em tampão de excisão, mostrando o mesmo padrão e tamanho de bandas (dados não mostrados). Os tamanhos esperados para as diferentes bandas de cada isolado estão descritos na Tabela 3.6. O aparecimento de bandas não previstas que migraram menos no gel, podem ser o circularizada (Fig. 3.4). O RNA circular apresenta um padrão de migração no gel diferente quando comparado ao RNA linear (Einvik *et al.* 1997). Foi excluída a possibilidade dessas bandas serem DNA, pois o material foi previamente digerido com DNase.

Tabela 3.6. Tamanho esperado para as diferentes bandas de cada isolado.

	<i>PSA-V3</i>	<i>PSA-G4</i>	<i>PSA-T10</i>	<i>PSA-L8</i>
Pré-RNA	856 pb	1032 pb	1149 pb	1295 pb
Introns excisados	616 pb	792 pb	909 pb	1055 pb
Exons ligados	240 pb	240 pb	240 pb	240 pb

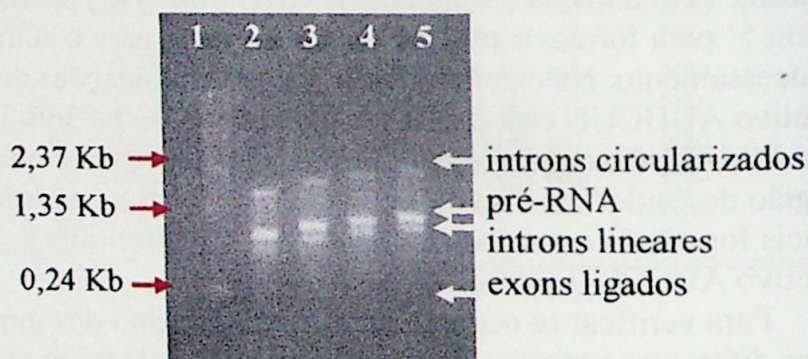


Figura 3.4. Reação de auto-processamento (self-splicing) *in vitro* visualizada em gel de agarose 0,7%. Coluna 1, RNA ladder (Invitrogen); coluna 2, *PSA-V3*; coluna 3, *PSA-G4*; coluna 4, *PSA-T10*; coluna 5, *PSA-L8*.

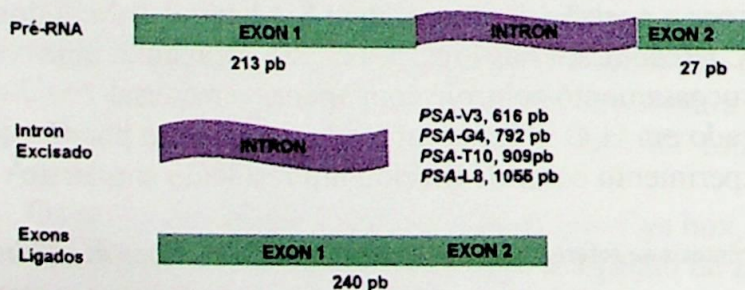


Figura 3.5. Esquema das bandas visualizadas no gel de agarose na Figura 3.4

Para confirmar se as bandas menores (Fig. 3.4) eram os exons ligados, era necessário amplificá-las por RT-PCR e seqüenciar o cDNA. No entanto, essas bandas quando excisadas do gel e submetidas a RT-PCR não geravam cDNA. Isso ocorreu devido à perda de material durante o processo de purificação das bandas do gel. Como segunda opção, foi feita uma RT-PCR diretamente a partir do RNA que ficou incubado no tampão de auto-processamento, reação 1 (o mesmo material que foi corrido no gel, Fig. 3.4) e outra a partir do RNA da reação controle (reação 2). Ambos os RNA moldes geraram produtos de RT-PCR equivalentes (Figura 3.6).

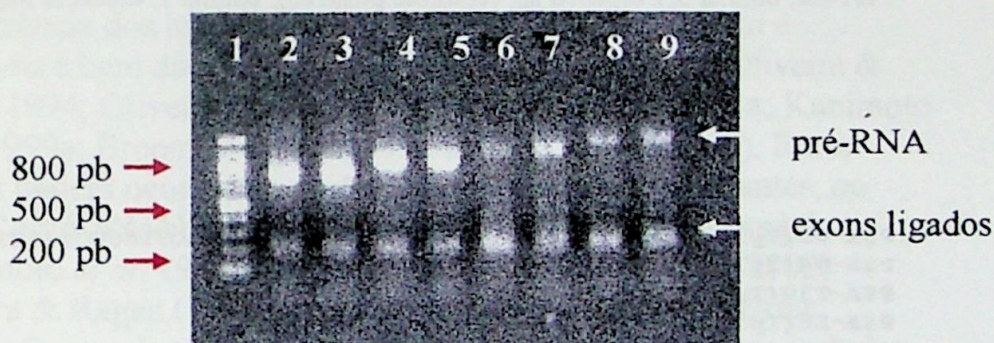


Figura 3.6. cDNA visualizando em gel de agarose 2%. Coluna 1, 100 pb DNA ladder (Promega); coluna 2 e 3, *PSA-V3*; coluna 4 e 5, *PSA-G4*; coluna 6 e 7, *PSA-T10*; coluna 8 e 9, *PSA-L8*.

As bandas equivalentes aos exons ligados foram excisadas do gel, purificadas e submetidas a uma nova PCR com os “primers” 1400F e 18S3’, que se ligam aos exons (Fig. 3.7).

Além dos quatro isolados, foram feitos também um controle positivo e um controle negativo. O controle positivo foi feito com um DNA alvo contendo intron e o controle negativo foi feito sem DNA. O produto desta PCR foi purificado e seqüenciado nas direções direta e reversa, e o ponto exato da junção dos exons está indicado na Figura 3.8. Portanto, foi possível comprovar que as diferentes variantes de tamanho do intron se excisam *in vitro* e que isso pode ocorrer apenas na presença de H₂O.

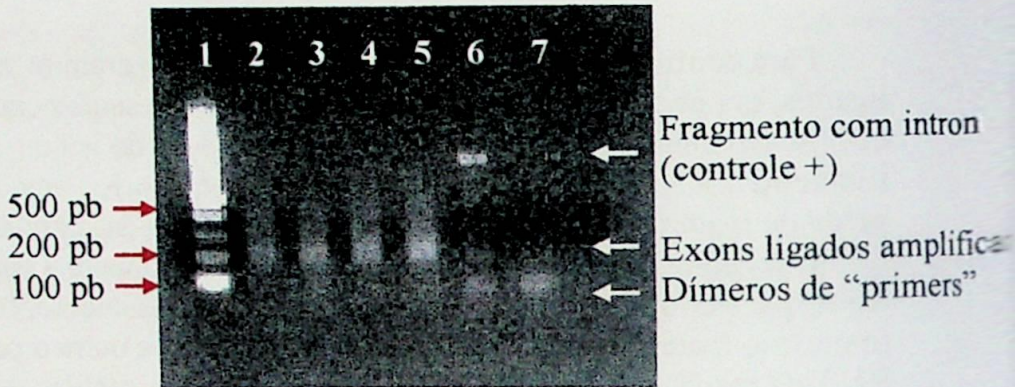


Figura 3.7. Produto da PCR de cDNA cortado do gel e amplificado com os “primers” 1400F e 18S3’, visualizando em gel de agarose 2%. Coluna 1, 100 pb DNA ladder; coluna 2, *PSA-V3*; coluna 3, *PSA-G4*; coluna 4, *PSA-T10*; coluna 5, *PSA-L8*; coluna 6, *Porphyras* sp. (controle positivo); coluna 7, controle negativo.

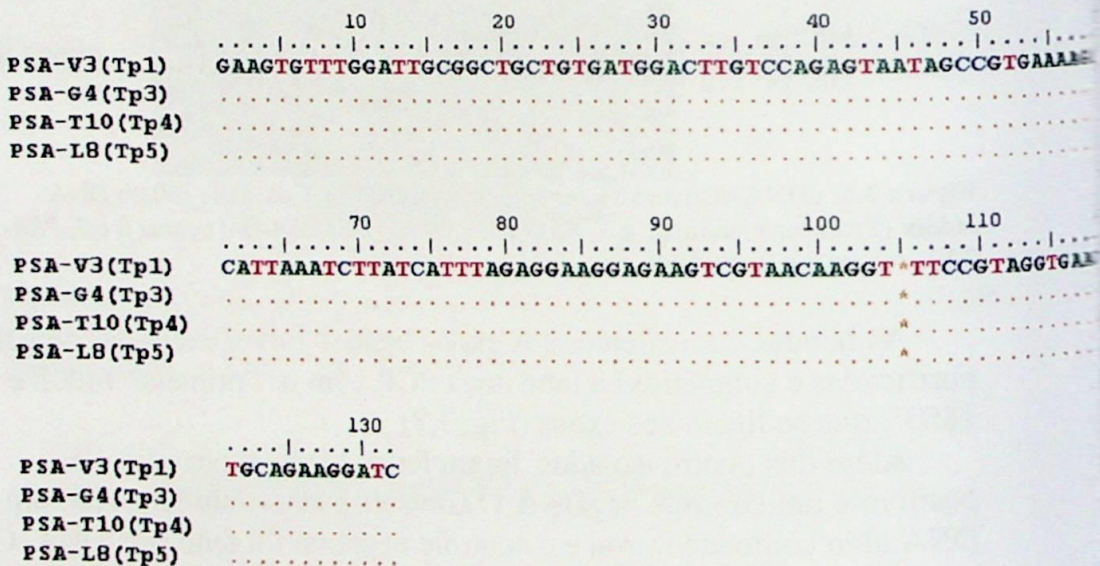


Figura 3.8. Alinhamento de seqüências dos isolados *PSA-V3* (Tipo 1), *PSA-G4* (Tipo 3), *PSA-T10* (Tipo 4), *PSA-L8* (Tipo 5) após a excisão do intron. A seqüência completa é dada apenas para o primeiro isolado. Posições idênticas são indicadas por pontos (.). A posição de número 105, indicada por asterisco (*) localiza o sítio onde ocorre a junção dos exons ou excisão/inserção do intron. Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. Tp- tipo.

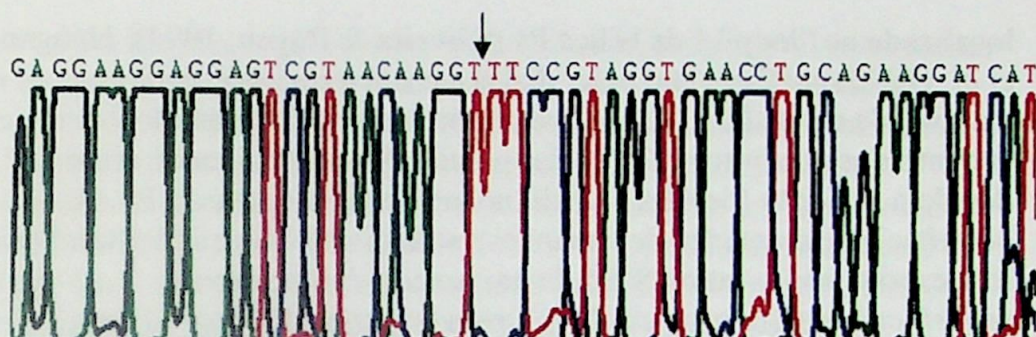


Figura 3.9. Cromatograma do seqüenciamento de *PSA-V* com o “primer” 1400F. A flecha indica o sítio onde ocorre a junção dos exons ou excisão/inserção do intron. O resultado do seqüenciamento foi o mesmo para os 4 isolados.

Discussão

A ocorrência dos introns S516 e S1506 nos gêneros *Bangia* e *Porphyra* é bem documentada (Stiller & Waaland 1993; Oliveira & Ragan 1994; Oliveira *et al.* 1995; Müller *et al.* 1998, 2001a; Kunimoto *et al.* 1999a; Broom *et al.* 2002, Milstein & Oliveira 2005). Esses introns podem ocorrer em espécies filogeneticamente distantes, ou podem estar presentes e ausentes em isolados da mesma espécie (Kunimoto *et al.* 1999a, Müller *et al.* 2001a, Broom *et al.* 2002). Oliveira & Ragan (1994) foram os primeiros autores a reportar polimorfismos de tamanho ocorrendo nos introns S1506 dos isolados *PSA-B*, *PSA-D* e *PSA-R* coletados em três locais distintos.

Aumentando o número de isolados e os locais de amostragem, constatamos que os introns S1506 que ocorrem nos isolados de *P. spiralis* var. *amplifolia* coletadas nas costas sul e sudeste do litoral do Brasil apresentam polimorfismos de tamanho. Considerando os dados de Oliveira & Ragan (1994) foram descritos cinco tipos de polimorfismos, sendo o intron de maior tamanho o mais recorrente. O tamanho dos introns é conservado dentro das populações, exceto nas populações *PSA-S* e *PSA-T*, que também apresentam dois introns de tamanhos diferentes ocorrendo em um único isolado. O intron S1506 de *PSA* difere em 30%-44% em seqüência de nucleotídeos dos demais introns S1506 seqüenciados para *Bangia* e *Porphyra* (Müller *et al.* 2001a) e difere em 0%-0.5% nas regiões conservadas dos introns das populações analisadas.

Os polimorfismos de tamanho para os introns de *PSA-B*, *PSA-D* e *PSA-R* ocorreram devido à variação no tamanho da seqüência

localizada no “loop” 1 da hélice P1 (Oliveira & Ragan, 1994). Haugen *et al.* (1999) confirmaram esses dados e chamaram essa região variável de extensão P1. Todos os polimorfismos de tamanho encontrados nos introns S1506 das populações de *PSA*, ocorreram devido à variação (de 42 a 482 pb) no tamanho da extensão P1. A ocorrência de extensões de tamanhos variáveis no domínio P1 também foi descrita para o intron S516 de um isolado de *Porphyra suborbiculata* (Broom *et al.* 2002), para o intron S1506 de alguns isolados de *Bangia* e *Porphyra* (Haugen *et al.* 1999, Müller *et al.* 2001a), para introns do grupo I dos mixomicetos *Physarum polycephalum* (Muscarella *et al.* 1990) e *Physarum flavicomum* (Vader *et al.* 1994), e para a alga verde *Scenedesmus pupukensis* (Haugen *et al.* 1999) entre outros.

A extensão no domínio P1 do intron S1506 de *PSA*-R apresenta uma ORF localizada na fita complementar àquela que codifica o SSU rDNA e o intron (Vader *et al.* 1994, Haugen *et al.* 1999). Müller *et al.* (2001a) descreveram ORFs ocorrendo em isolados de *Bangia* e *Porphyra* como extensões do domínio P1 para os introns S1506, e extensões do domínio P2 para os introns S516. A partir dos 17 alelos do intron S1506 de *PSA*, foi possível estabelecer nove tipos diferentes de ORFs ocorrendo na extensão P1 fita complementar àquela que codifica o SSU rDNA e o intron.

Uma vez que as ORFs foram estabelecidas, verificamos que o que ocasiona os polimorfismos de tamanho nos introns das diferentes populações de *PSA* são os mesmos tipos de deleções citadas por Haugen *et al.* (1999) para os isolados de *PSA* descritos por Oliveira & Ragan (1994). Foi sugerido por Haugen *et al.* (1999) que os polimorfismos para o tamanho dos introns ocorreram devido a deleções nos domínios da ORF na hélice P1 do intron.

A ORF que ocorre no intron do grupo I de *Physarum polycephalum* codifica uma endonuclease de “homing” intacta, chamada de *I-PpoI* (Muscarella *et al.* 1990). O motivo His-Cys box foi caracterizado por Johansen *et al.* (1993) ocorrendo na metade C-terminal das endonuclease de “homing” *I-Dir*, *I-Naa* e *I-PpoI*. A ORF que ocorre na fita complementar de *PSA*-R parece ser um pseudogene de uma endonuclease de “homing” do tipo His-Cys box (Haugen *et al.* 1999). De acordo com Vader *et al.* (1994), o motivo His-Cys box de *PSA* tem 57% de identidade com o His-Cys box da enzima *I-PpoI*.

Nos introns seqüenciados neste trabalho, foi possível caracterizar o motivo His-Cys box na fita complementar à fita codificante dos introns do Tipo 4 e 5. No entanto, a seqüência intacta do motivo His-Cys box e do sítio de ligação a zinco ocorreu apenas para dois isolados da população *PSA-I*, dois isolados de *PSA-L* e dois isolados de *PSA-T* (todos do Tipo 5, vide Tab. 3.4). Os demais isolados do Tipo 4 e 5 apresentaram truncamentos nas ORFs e o motivo His-Cys box apenas é verificado quando “frame-shifts” são inseridos manualmente. Com inserção de “frame-shifts”, os motivos His-Cys box de todos os introns do Tipo 4 e 5 apresentaram os resíduos conservados propostos estar diretamente envolvidos com o sítio de ligação de zinco (C100, C105, H110, C125, C132, H134, C138) e com o sítio ativo (H98, N119) da endonuclease *I-PpoI* (Flick *et al.* 1998). Os truncamentos quando não corrigidos com “frame-shifts”, geraram ORFs com códons de parada prematuros e não funcionais, sugerindo se tratar de pseudogenes. Os motivos His-Cys box intactos que ocorrem em alguns introns precisam ser expressos em proteínas e testados para atividade endonucleolítica, para confirmarmos se são genes funcionais ou pseudogenes.

Müller *et al.* (2001) reportaram que o motivo His-Cys box estava presente apenas em isolados de *Porphyra* com as maiores inserções no domínio P1. Em concordância com esses dados, os Tipos 1, 2 e 3 dos introns S1506 de *PSA* não apresentaram o motivo His-Cys box. Os genes que codificam as HEGs são genes não essenciais, distribuídos em fungos, protistas, bactérias e vírus, sem função conhecida para o hospedeiro (Belfort & Roberts 1997). São considerados genes “egoístas” ou “parasitas” que se auto-propagam nas populações, devido a sua atividade catalítica (codificam endonucleases sítio-específicas), pelo mesmo mecanismo de “homing” descrito no Capítulo I para os introns (Goddard & Burt 1999). Esses autores sugerem que o HEG quando associado a um intron, apresenta um ciclo: um HEG funcional invade um sítio por transferência lateral, se fixa em uma população, sofre degeneração, que gera um HEG não funcional; depois é perdido com excisão precisa, para que o sítio de reconhecimento seja restabelecido para ser então invadido novamente (Fig. 3.7).

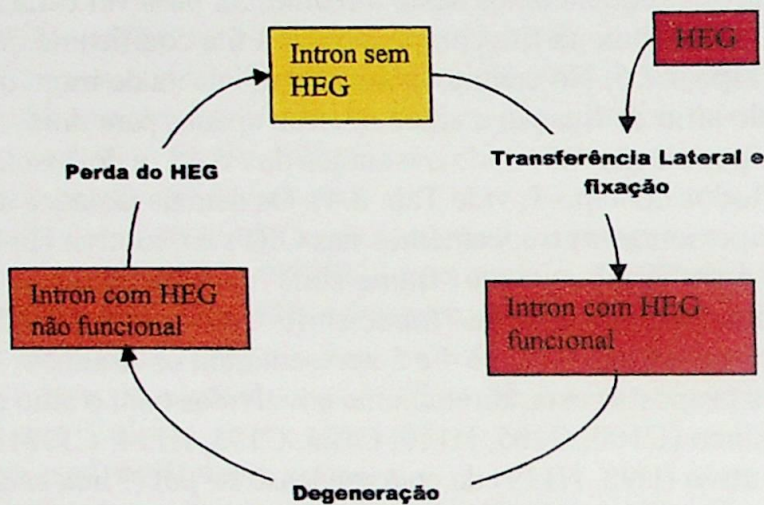


Figura 3. 7. Modelo do ciclo de ganho e perda do HEG (Goddard & Burt 1999).

Haugen *et al.* (2004b) notaram que mesmo se o HEG for perdido de uma população após ter se fixado em todos os isolados, o intron contendo o HEG ativo pode continuar o ciclo de “homing” invadindo populações sem introns de uma mesma espécie ou de uma espécie proximamente relacionada. Os diferentes polimorfismos de tamanho que ocorrem nos introns S1506 de *PSA* podem estar refletindo as diferentes etapas do ciclo proposto para as endonucleases de “homing”. Algumas ORFs dos introns do Tipo 5 estariam entrando em processo de degeneração, de maneira gradual (o que pode explicar os cinco polimorfismos de tamanho) até atingir o tamanho do intron do Tipo 1. Nas ORFs de alguns alelos do Tipo 5 ocorrem pequenos truncamentos no motivo His-Cys box devido à degeneração de nucleotídeos (mutações ou “indels”), nas ORFs dos alelos do Tipo 4 começam a haver pequenas perdas de regiões, porém o motivo His-Cys box ainda ocorre, mesmo que truncado. Nas ORFs dos alelos dos Tipos 1, 2 e 3 o motivo His-Cys box foi totalmente perdido, restando apenas o início do HEG no Tipo 2 e 3 (após extensivas deleções) e no caso do alelo do Tipo 1, ocorreu a perda total ou nenhuma aquisição de ORF.

Segundo Dujon (1989), vários exemplos de introns do grupo I sem ORF são conhecidos. No entanto, eles tendem a desaparecer com o tempo, enquanto os introns com ORF funcionais se perpetuam e se propagam. Até o presente momento, todos os isolados de *P. spiralis*

var. *amplifolia* seqüenciados apresentaram o intron S1506 no SSU rDNA. A perda dos introns é menos freqüente para os introns que codificam endonucleases, pois todo alelo sem intron pode ser repostado pelo alelo contendo o intron pelo processo de homing se a integridade da ORF estiver preservada. Assim, introns do grupo I que codificam endonucleases, contribuem para a manutenção dos introns nos genomas.

O intron S1506 de *PSA* está inserido próximo à extremidade 3' do SSU rDNA, entre os motivos CAAGGU e UUCCG. O motivo UUCCG é conservado entre o SSU rDNA dos eucariontes, e aparece duplicado quando o intron S1506 está inserido no gene. Uma cópia ocorre no SSU rDNA e a outra no intron (Oliveira & Ragan 1994). O motivo UUCCG também está duplicado no intron, porém de forma inversa (GCCUU). Na montagem da estrutura secundária, notamos que o motivo GCCUU faz parte do IGS cujo motivo completo é 5'-CCUACUGAAGCCUU-3'. O motivo CCUACUGAA parece com o motivo 5'-uuccguagg-3' do exon 2 e o motivo GCCUU parece com o motivo 5'-aaggu-3' do exon 1 (Fig.3.2). A guanosina do GCCUU parece com a U do exon 1 para formar o sítio de reconhecimento de auto-processamento. Outras seqüências de repetição direta ocorrem na extensão do domínio P1 das populações de *PSA*. O motivo repetido AUGCUU é conservado em todas as populações analisadas, exceto em *PSA-V* (Tipo 1) que não apresenta cópias desse motivo, e em *PSA-B* (Tipo 2) que apresenta o motivo em cópia única. Oliveira & Ragan (1994) notaram que um dos motivos inicia a inserção de uma seqüência extra (motivo His-Cys box + um domínio opcional variável presente nos introns dos Tipos 3, 4 e 5) e o outro ocorre imediatamente após este domínio opcional (Anexo 3.A). Um esquema possível para explicar a distribuição dos HEGs no S1506 em *PSA* seria: *PSA-B* (Tipo 2) seria uma versão do intron sem o HEG (apresenta apenas 1 motivo AUGCUU), os introns do Tipo 5 seriam a versão do intron + HEG intacto, os introns do Tipo 3 e 4 representariam a degeneração do HEG e o intron do Tipo 1 teria perdido todo o HEG (não apresenta o motivo AUGCUU) juntamente com regiões adjacentes do "loop" da hélice P1.

Motivos de repetições diretas também foram descritos ocorrendo em um domínio opcional da hélice P1 do intron do grupo I de *Physarum flavicomum*. Muitas vezes, as repetições diretas estão associadas à inserção de um elemento móvel em um gene, que durante

o processo de inserção duplica o sítio de “homing” (Vader *et al.* 1994).

Muitos introns do grupo I parecem ser um mosaico de elementos genéticos (Haugen *et al.* 2005), em que os HEGs e seus introns associados tem provavelmente origens independentes (Lambowitz & Belfort 1993, Gimble 2000, Haugen *et al.* 2005). Os HEGs podem se inserir em introns do grupo I e mover-se independente do intron, ou podem mover-se juntamente com o intron formando uma unidade. Portanto, a evolução dos introns do grupo I e os HEGs associados é mais dinâmica do que previsto (Haugen *et al.* 2005).

A identificação do IGS e de motivos de repetição direta que flanqueiam as ORFs presentes nos introns nos instiga a propor um cenário onde os introns do grupo I teriam sido inseridos no SSU rDNA de uma *PSA* ancestral pelo mecanismo de auto-processamento reverso (independente da atividade da endonuclease), e posteriormente teriam sido invadidos por HEGs funcionais, que existem atualmente na forma de pseudogenes. Baseados em dados filogenéticos, Haugen *et al.* (1999) sugeriram que a transferência lateral dos HEGs durante a evolução de *Bangiophycidae* ocorreram independente dos introns.

O auto-processamento reverso é o modelo mais provável para a transferência lateral de introns do grupo I, devido a baixa especificidade de seqüências de reconhecimento (4-6 nt) em comparação ao “homing” que requer um sítio de reconhecimento de 15-45 nt. (Haugen *et al.* 2005). Está hipótese é apoiada por dados bioquímicos e filogenéticos (Bhattacharya *et al.* 2002).

Os introns S1506 que ocorrem nas diferentes populações de *PSA* foram caracterizados como sendo pertencentes ao grupo IC1, assim como foram caracterizados os intron de *PSA-B*, *PSA-D* e *PSA-R* por Oliveira & Ragan (1994). A estrutura secundária típica de um intron do grupo I (Fig. 1.7, Introdução) possui na região central o núcleo catalítico, isto é, um agrupamento de elementos estruturais conservados necessários para a atividade catalítica dos introns do grupo I (Michel *et al.* 1982, Cech 1988). Experimentos *in vitro* comprovaram que a perda ou o dano de uma das partes deste núcleo impede que intron exerça as suas atividades catalíticas (Cech 1988, Cech 1990).

Como a propriedade catalítica é altamente dependente da estrutura tridimensional do intron (Golden *et al.* 1998), verificamos se as diferentes variantes de tamanho se excisavam *in vitro*. As quatro

variantes de tamanho do intron aqui estudadas, se excisaram *in vitro* apenas em presença de H₂O. Durante a transcrição, pode ocorrer uma ligeira degradação do pré-RNA, que fornece a quantidade necessária de guanosina para a reação de auto-processamento (Dürrenberber & Rochaix 1991). Uma das maneiras de se certificar que houve a excisão do intron, é através da comprovação de que os exons se ligaram (Cech & Bass 1986; Cech 1988, 1990). Utilizando a técnica de RT-PCR e o seqüenciamento do cDNA foi possível verificar que o fragmento de menor tamanho resultante da reação de auto-processamento eram os exons.

A ocorrência de extensões de diferentes tamanhos no domínio P1 não impediram a reação de auto-processamento do intron, embora exista uma hipótese de que o ganho de HEG no intron, diminua a eficiência do auto-processamento (Haugen *et al.* 2005).

Quando os introns do grupo I se excisam do rRNA, não causam nenhum tipo de fenótipo no gene, independente do sítio de inserção. Os introns do grupo I podem ser parasitas silenciosos capazes de se manter ou se dispersar nos genomas (Haugen *et al.* 2004b), garantindo também a propagação dos HEGs associados. Os HEGs invadem regiões periféricas de “loop” de hélices como as P1, P2, P6, P8 e P9 (Turmel *et al.* 1995, Haugen *et al.* 1999). Mutações no núcleo catalítico do intron podem inibir a reação de auto-processamento, no entanto, alguns “loops” periféricos podem ser completamente deletados sem maiores perdas da função de auto-processamento (Cech 1990). Conforme foi comprovado neste trabalho, polimorfismos de tamanhos nos “loops” não afetam o mecanismo de auto-processamento dos introns, portanto esses “loops” se tornam locais estratégicos para elementos genéticos móveis, que têm sido considerados altamente invasores como os HEGs.

O auto-processamento está relacionado com a manutenção da existência do gene. Se os introns do grupo I perdessem a sua capacidade de se auto-excisar do transcrito primário, eles provavelmente seriam eliminados juntamente com os genes os quais eles estão inseridos, pois existe uma forte seleção contra genes de SSU rDNA não funcionais (Dujon 1989). Então, não interferindo na reação de auto-processamento, os HEGs associados ao intron passam despercebidos pela seleção natural e estabilizam a sua relação com o organismo hospedeiro, pois são eliminados do pré-RNA juntamente com os introns.

Referências Bibliográficas

- Adams P.L., Stahley M.R., Kosek A.B., Wang J. & Strobel S.A. 2004a. Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature* 430: 45-50.
- Adams P.L., Stahley M.R., Gill M.L. Kosek A.B., Wang J. & Strobel S.A. 2004b. Crystal structure of a group I intron splicing intermediate. *RNA*. 10: 1867-1887.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Molecular Biology* 215: 403-410.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. & Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Belfort M. & Perlman P.S. 1995. Mechanisms of intron mobility. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (51): 30237-30240.
- Belfort M. & Roberts R.J. 1997. Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res.* 25: 3379-3388
- Bell-Pedersen D., Quirk S. Clyman J. & Belfort M. 1990. *Nucleic Acids Res.* 18: 3763-3770.
- Bhattacharya, D., Friedl, T. & Helms G. 2002. Vertical evolution and intragenic spread of lichen-fungal group I introns. *J. Mol. Evol.* 55: 74-84.
- Bhattacharya d., Reeb V. Simon D.M & Lutzoni F. 2005. Phylogenetics analyses suggest reverse splicing spread of group I introns in fungal ribosomal RNA. *BMC Evolutionary Biology* 5 (68): 1-11.
- Broom J.E., Nelson W.A., Yarish C., Jones W.A, Aguilar Rosas R. & Aguilar Rosas L.E. 2002. A reassessment of the taxonomic status of *Porphyra suborbiculata*, *Porphyra carolinensis* and *Porphyra lilliputiana* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *European Journal of Phycology* 37: 227-235.
- Cabot, E. L. & Beckenbach, A. T. 1989. Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Comput. Appl. Biosci.* 5:233-4.
- Cech, T.R. 1988. Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis – a review. *Gene* 73: 259-271.
- Cech, T.R. 1990. Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543-568.
- Cech, T.R. 2002. Ribozyme mechanisms and folding. *Biochemical Society Trans.* 30 (6): 1162-116.
- Cech, T.R. & Bass, B.L. 1986. Biological catalysis of RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 599-629.
- Cech T.R. & Herschlag D. 1996. Group I ribozymes: substrate recognition, catalytic strategies and comparative mechanistic analysis. *Nucleic Acids Molecular Biology* 10: 1-17.
- Chevalier B.S. & Stoddard L. 2001. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res.* 29: 3757-3774.
- Davies R.W., Waring R.B., Ray J.A., Brown T.A. & Scazzocchio C. 1982. Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria. *Nature* 300: 719-724.

- Dujon B. 1989. Group I intron as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations – a review. *Gene* 82: 91-114.
- Dürrenberger F. & Rochaix J.D. 1991. Chloroplast ribosomal intron of *Chlamydomonas reinhardtii*: *in vitro* self-splicing, DNA endonuclease activity and *in vivo* mobility. *EMBO J.* 10: 3495-3501.
- Einvik C., Decatur W.A., Embley T.M., Vogt V.M. & Johansen S. 1997. *Naegleria* nucleolar introns contain two group-I ribozymes with different functions in RNA splicing and processing. *RNA* 3: 710-720.
- Flick K.E., Jurica M.S. Monnat, R.J. & Stoddard B.L. 1998. DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-PpoI *Nature* 394: 96-101.
- Gimble F.S. 2000. Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonucleases genes. *FEMS microbiol. lett.* 185: 99-107.
- Goddard M.R. & Burt A. 1999. Recurrent invasion and extinction of a selfish gene. *PNAS* 96: 13880-13885.
- Golden B.L., Gooding A.R., Podell E.R. & Cech T.R. 1998. A preorganized active site in the crystal structure of the *Tetrahymena* ribozyme. *Science* 282: 259-264.
- Haugen P., Huss V.A.R., Nielsen H. & Johansen S. 1999. Complex group-I introns in nuclear SSU rDNA of red and green algae: evidence of homing-endonuclease pseudogenes in the Bangiophyceae. 36: 345-353.
- Haugen P., Reeb V., Lutzoni F. & Bhattacharya D. 2004b. The evolution of homing endonuclease genes and group I introns in nuclear rDNA. *Molecular Biology and Evolution* 21(1): 129-140.
- Haugen P., Simon D.M. & Bhattacharya D. 2005. The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* 21(2): 111-119.
- Johansen S., Embley T.M. & Willassen N.P. 1993. A family of nuclear homing endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 21: 4405.
- Kunimoto, M., Kito, H., Yamamoto, Y., Cheney, D.P., Kaminishi, Y. & Mizukami, Y. 1999a. Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Applied Phycology* 11: 203-209.
- Lambowitz A.M. 1989. *Cell* 56: 323-26.
- Lambowitz, A. M. & Belfort M. 1993. Intron as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 587-622.
- Michel, F & Westhof, E. 1990. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Molecular Biology* 216: 585-610.
- Michel F., Jacquier A. & Dujon B. 1982. Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure. *Biochimie.* 64: 867-881.
- Milstein D. & Oliveira M. C. 2005. Molecular phylogeny of Bangiales (Rhodophyta) based on small subunit rDNA sequencing: Emphasis on Brazilian *Porphyra* species. *Phycologia* 44 (2): 212-221.
- Müller, K.M., Sheath, R.G., Vis, M.L., Crease, T.J. & Cole, K.M. 1998. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the RuBisCo spacer, *rbcL* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. 1. North America. *Phycologia* 37: 195-207.

- Müller K.M., Cannone J.J., Gutell R.R. & Sheath R.G. 2001a. A Structural and Phylogenetic Analysis of the Group IC1 Introns in the Order Bangiales (Rhodophyta). *Molecular Biology and Evolution* 18: 1654-1667.
- Muscarella D.E., Ellison E.L., Ruoff B.M. & Vogt V.M. 1990. Characterization of I-*Ppo*, an intron-encoded endonuclease that mediates homing of a group I intron in the ribosomal DNA of *Physarum polycephalum*. *Molecular Cell Biology* 10: 3386-3396.
- Oliveira, E.C. & Coll, J. 1975. The genus *Porphyra* C. Ag. (Rhodophyta-Bangiales) in the American South Atlantic. I. Brazilian species. *Bot. Mar.* 18: 191-197.
- Oliveira, M.C. & Ragan, M.A. 1994. Variant forms of a group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Mol. Biol. Evol.* 11:195-207.
- Oliveira M.C., Kurniawan J., Bird C.J., Rice E.L., Murphy C.A., Singh R.K., Gutell R.R. & Ragan M.A. 1995. A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiothycidae, Rhodophyta) based on sequences of the nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. *Phycological Research* 43: 71-79.
- Stiller, J.W. & Waaland, J.R. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 29(4): 506-517.
- Turmel M., Cote V., Otis C., Mercier J.P., Gray M.W., Lonergan K.M. & Lemieux C. 1995. Evolutionary transfer of ORF-containing group I introns between different subcellular compartments (chloroplast and mitochondrion) *Mol. Biol. Evol.* 12: 533-545.
- Vader A., Naess J., Haugli K., Haugli F. & Johansen S. 1994. Nucleolar introns from *Physarum flavicomum* contain insertion elements that may explain how mobile group-I introns gained their open reading frames. *Nucleic Acids Res.* 22: 4553-4559.
- Westhof E. 2002. Group I introns and RNA folding. 2002. *Biochemical Society Trans.* 30 (6): 1149-1152.
- Woodson S.A. & Cech T.R. 1989. Reverse splicing of the *Tetrahymena* group I intron: implication for the directionality of splicing and for intron transposition. *Cell* 57: 335-345.
- Zaug A.J., Grabowski P.J. & Cech T.R. 1983. Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction *Nature* 301: 578-83.

ANEXO 3.A

Alinhamento de seqüências

Alinhamento das seqüências completas (estrutura primária) dos diferentes alelos dos introns S1506 do grupo I que ocorrem no SSU rDNA de isolados de *PSA* de diferentes locais (para legenda, ver Tabela 3.3). A seqüência completa é dada apenas para o primeiro isolado. Posições idênticas são indicadas por pontos (.) e lacunas por traços (-). Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. A região do exon que flanqueia o intron está em letra minúscula e a seqüência do intron em letra maiúscula. O pareamento u:G que define a extensão P1 está grifado em verde. Motivos em repetições diretas estão delineados por retângulos. Os retângulos azuis abertos estão delimitando a ORF, e os traços vermelhos sobre as seqüências, indicam o motivo His-Cys Box. A seta indica a direção da ORF, e círculo destaca o IGS. As regiões com as grandes inserções de lacunas representam as regiões localizadas nas hélices P1 de inserção/deleção das variantes de tamanho dos introns. Tp-tipo, H- alelo.

	10	20	30	40	50	60
H1-tp5	caagg	JUCCG	AAAGGGGCAAAGAGG	CUAGUGACUCAUCCAAAGACUUACGAG	AUGCUU	
H2-tp5			A			
H3-tp5						
H4-tp5						
H5-tp5						
H6-tp4						
H7-tp4						
H8-tp3						
H9-tp3						
H10-tp3						
H11-tp3						
H12-tp3						
H13-tp3						
H14-tp2						
H15-tp1						
H16-tp1						
H17-tp1						

	70	80	90	100	110	120
H1-tp5	UAUUAGACGCACUGCGGUGUAUGAAGACACUUG-AACUCCGGGUGGUUACGCAUGAGACG					
H2-tp5	C					
H3-tp5			G			
H4-tp5						
H5-tp5						
H6-tp4						
H7-tp4						
H8-tp3						
H9-tp3						
H10-tp3						
H11-tp3						
H12-tp3						
H13-tp3						
H14-tp2						
H15-tp1						
H16-tp1						
H17-tp1						

	130	140	150	160	170	180
H1-tp5	GCAGUAGAUGCGACUUUUGUUCAGGUCGCCGGACUCCAACGUUAAAUGCGCCUUGUUGAC					
H2-tp5						
H3-tp5						
H4-tp5						
H5-tp5						
H6-tp4						
H7-tp4						
H8-tp3						
H9-tp3						
H10-tp3						
H11-tp3						
H12-tp3						
H13-tp3						
H14-tp2						
H15-tp1						
H16-tp1						
H17-tp1						

190 200 210 220 230 240

H1-tp5 ACACUUAGCGUUGUGGCACGUGUGGGACGCCUCUUACCAGGGAGAGGGAGACGCUCAGU

H2-tp5

H3-tp5

H4-tp5

H5-tp5

H6-tp4

H7-tp4

H8-tp3 -----

H9-tp3 -----

H10-tp3 -----

H11-tp3 -----

H12-tp3 -----

H13-tp3 -----

H14-tp2 -----

H15-tp1 -----

H16-tp1 -----

H17-tp1 -----

250 260 270 280 290 300

H1-tp5 CGCUGCCACCGGACAAUGAUGUGGCAAUAGUACUUCGUGCCUUGAUAGCGCAGUUGGAC

H2-tp5

H3-tp5

H4-tp5

H5-tp5

H6-tp4

H7-tp4

H8-tp3 -----

H9-tp3 -----

H10-tp3 -----

H11-tp3 -----

H12-tp3 -----

H13-tp3 -----

H14-tp2 -----

H15-tp1 -----

H16-tp1 -----

H17-tp1 -----

310 320 330 340 350 360

H1-tp5 GUAACCGCCAGAGACCUAGCA--GGGGCGUAGUCCGUCACAAUGCAGCCGUUCUCCAU

H2-tp5GCA.....

H3-tp5

H4-tp5

H5-tp5

H6-tp4 -----C.....

H7-tp4 -----C.....

H8-tp3

H9-tp3

H10-tp3

H11-tp3

H12-tp3

H13-tp3

H14-tp2

H15-tp1

H16-tp1

H17-tp1 -----

370 380 390 400 410 420

H1-tp5 GGAGUGCGA **AUGCUU** CUCUAACUGCUCACAGUACAGCUUGCUGGACGUGAUGGAGCAAGAA

H2-tp5

H3-tp5

H4-tp5

H5-tp5

H6-tp4

H7-tp4

H8-tp3

H9-tp3

H10-tp3

H11-tp3

H12-tp3

H13-tp3

H14-tp2

H15-tp1 -----

H16-tp1 -----

H17-tp1 -----

430 440 450 460 470 480

H1-tp5 CUUCUCGUAAGCG-UGGGUGGGCGCGACGUCCAUGG-UAAUGAGACCUUCUCUGCAGGAC

H2-tp5

H3-tp5

H4-tp5

H5-tp5

H6-tp4

H7-tp4

H8-tp3

H9-tp3

H10-tp3

H11-tp3

H12-tp3

H13-tp3

H14-tp2

H15-tp1 -----

H16-tp1 -----

H17-tp1 -----

490 500 510 520 530 540

H1-tp5 ACAUACC-**UACU** **UAGCCUU** UJCGGCCCGAAAGGGUGCGCGGUCACGACAUUAAAUAAAG

H2-tp5

H3-tp5

H4-tp5

H5-tp5

H6-tp4

H7-tp4

H8-tp3

H9-tp3

H10-tp3

H11-tp3

H12-tp3

H13-tp3

H14-tp2

H15-tp1

H12-tp3
H13-tp3
H14-tp2
H15-tp1
H16-tp1
H17-tp1

ANEXO 3.B

Alinhamento de seqüências

Alinhamento de seqüências das regiões conservadas entre os diferentes alelos (H) dos isolados de *PSA*. A região conservada (sem a extensão P1) inicia-se a partir da G do pareamento U*G, posição 497 do alinhamento do Anexo 3.A. Os alelos H1 a H5; H7 a H11; H13 e H17 são 100% idênticos nessa região (representados pelo alelo H1). A seqüência completa é dada apenas para o primeiro isolado. Posições idênticas são indicadas por pontos (.) e lacunas por traços (-). Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. Tp- Tipo.

	10	20	30	40	50	60
H1-tp3	CCUUUGCGGCCCGAAAGGGUGCGCGGUCACGACA	UUAAA	UAAAGAGCCG	UGUU	CAACGCA	
H6-tp4					
H12-tp3					
H14-tp2					
H15-tp1					
H16-tp1A.....					
	70	80	90	100	110	120
H1-tp3	AGUGACGGGG-AGAGAGGACUGAAAGUGACGGGGAAAAGUCGC	UUUU	GUUGGCGAC	UUUC		
H6-tp4G.....					
H12-tp3-					
H14-tp2-					
H15-tp1-					
H16-tp1-					
	130	140	150	160	170	180
H1-tp3	CCGAGUGGGGGU	GCCAAGGUA	UUUAUAUCGCGGUA	UAUAUAUA	UCCUACAAU	AGACGACG
H6-tp4					
H12-tp3A.....					
H14-tp2C.....					
H15-tp1					
H16-tp1					
	190	200	210	220	230	240
H1-tp3	CAGUCAGUCCGAAAACCCAGUUGCU	UACCUUUU	CAAAUUGCGGGAAU	CCCCU	AAGAGCCCA	
H6-tp4					
H12-tp3					
H14-tp2					
H15-tp1					
H16-tp1					
	250	260	270	280	290	300
H1-tp3	UCACUACCGCGGCCGUUGUGGAAAACACUCGGU	GCAGCAGGCGAGGU	AGUU	CCCCGCUGG		
H6-tp4					
H12-tp3					
H14-tp2					
H15-tp1G.....					
H16-tp1					
	310	320	330	340	350	360
H1-tp3	AUGGUAAUAAGGUGAUGGGAUUGUCUCU	AGAGACUUGCAA	UGGGCAAU	CCGCAGCCAAGU		
H6-tp4					
H12-tp3					
H14-tp2					
H15-tp1					
H16-tp1					
	370	380	390	400	410	420
H1-tp3	CCCUGUCAAAUGGGAAAGGUUCACAGACUGU	AAGGAAAGGGU	GCCGC	UCCUAUU	ACGC	

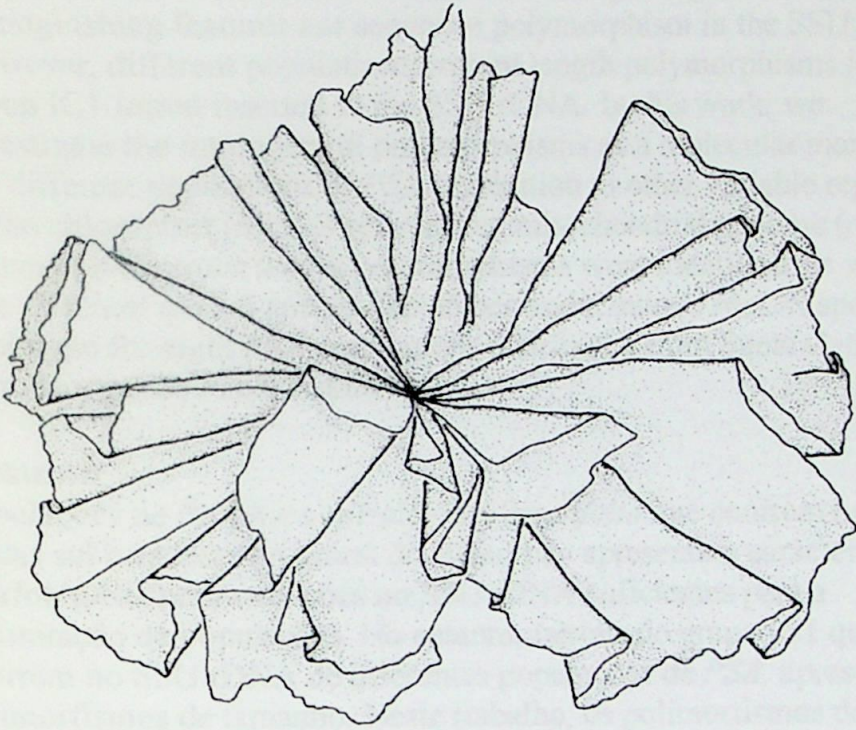
H6-tp4
H12-tp3
H14-tp2
H15-tp1
H16-tp1
	430 440 450 460 470 480
H1-tp3
H6-tp4	GGCGC UU AAGAGACAG UCGGU CCCC UCG GAAAGCAGAG UCCCGAAUU GGAGGAAAAGGCC
H12-tp3
H14-tp2
H15-tp1
H16-tp1
	490 500 510 520 530 540
H1-tp3
H6-tp4	CAUUAAAAGUGGGCUUUGGAGAGCCUCGGGAGGCCAGAGAGGAAAGGCUC CGCGCC UC
H12-tp3
H14-tp2
H15-tp1
H16-tp1	...G.....
	550 560 570
H1-tp3
H6-tp4	UCACUCGGCUGGGU CAAG UCCUU GAC UUU AUG
H12-tp3
H14-tp2
H15-tp1
H16-tp1

ANEXO 3.C

Alinhamento de seqüências

Alinhamento de seqüências de aminoácidos de ORFs geradas a partir dos 17 alelos (H) dos isolados de *PSA*. A seqüência completa é dada apenas para o primeiro isolado. Posições idênticas são indicadas por pontos (.), lacunas por traços (-) e códon de parada por asterísco (*). O motivo His-Cys box está indicado por um traço sobre a seqüência. Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. Tp- Tipo.

Capítulo 4



**Caracterização de marcadores genéticos para populações de
Porphyra spiralis var. *amplifolia* (Bangiales, Rhodophyta) das
costas sul e sudeste do Brasil**

Abstract

Populations of *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* in the Southern and Southeastern coast of Brazil do not show morphological distinguishing features nor sequence polymorphism in the SSU rDNA. However, different populations present length polymorphisms in the group IC1 intron inserted in the SSU rDNA. In this work, we investigate the intron length polymorphisms as a molecular marker for the different populations of *PSA* in addition to other variable regions of the chloroplast (*rbcL*-S spacer) and mitochondrial genome (*cox2-3* spacer). Five introns length polymorphisms were identified, as well as five different *cox2-3* spacer haplotypes and a unique *rbcL*-S spacer haplotype for eight *PSA* populations distributed from Santa Catarina up to North São Paulo Estate.

Resumo

Populações de *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* que ocorrem nas costas sul e sudeste do litoral do Brasil não apresentam características morfológicas nem variações no SSU rDNA suficientes para a delimitação de populações. No entanto, introns do grupo IC1 que ocorrem no SSU rDNA de diferentes populações de *PSA*, apresentam polimorfismos de tamanho. Neste trabalho, os polimorfismos de tamanho dos introns, o espaçador *rbcL*-S (cloroplasto) e o espaçador *cox 2-3* (mitocôndria) foram utilizados para delimitar as diferentes populações de *PSA*. Foram identificados cinco polimorfismos de tamanho de introns, cinco haplótipos para o espaçador *cox2-3* e um único haplótipo para o espaçador *rbcL*-S para oito populações de *PSA* distribuídas desde Santa Catarina até o norte do Estado de São Paulo.

Introdução

A exploração comercial de “nori”, a introdução de espécies exóticas e a maricultura dificultam a identificação da origem geográfica de *Porphyra* (Brodie *et al.* 1998, Kunimoto *et al.* 2003). Apesar da importância comercial do gênero *Porphyra*, os trabalhos científicos focam principalmente a filogenia e taxonomia do grupo e pouca atenção é dada a estudos populacionais.

O estudo das populações é muito importante para se detectar e quantificar a variabilidade genética dentro de uma espécie. Com esses dados é possível chegar a informações sobre fatores chaves que afetam a especiação e a extinção dos organismos (Wattier *et al.* 1997), como também estudar a dinâmica biogeográfica das populações.

Técnicas de biologia molecular têm sido bastante utilizadas em estudos de evolução e genética de populações (Avisé 1994), embora a sua aplicação em macroalgas seja ainda limitada. Estudos populacionais de algas realizados com análise de isozimas (Lu & Williams 1994, Sosa *et al.* 1996) relataram pouca variabilidade genética quando comparados a sua utilização em plantas superiores (Sosa & Lindstrom 1999). Técnicas como o RAPD (Wright *et al.* 2000, Faugeron *et al.* 2001, Marston & Bohnsack 2002) e o AFLP (Donaldson *et al.* 2000) também têm sido utilizados em estudos populacionais de algas marinhas, apesar de algumas limitações para esse tipo de análise. A utilização de microssatélites como marcadores populacionais é ideal para estudos de genética de populações, devido à sua alta variabilidade. Wattier *et al.* (1997) utilizaram microssatélites como marcadores para diferentes populações de *Gracilaria gracilis* com sucesso. Apesar de ser um eficiente marcador populacional, a utilização de microssatélites é um método caro, trabalhoso e que requer tempo e recursos para ser desenvolvido (Wattier *et al.* 1997, Zuccarello *et al.* 1999a).

Atualmente, o seqüenciamento de regiões genômicas como o ITS-1 e 2 (Vis & Sheath 1997, 1998, Marston & Bohnsack 2002), o espaçador *rbcL-S* (Zuccarello & West 1997, 2002) e o espaçador *cox2-3* (Marston & Bohnsack 2002, Zuccarello & West 2002, Chiasson *et al.* 2003, Cohen *et al.* 2004) têm sido utilizados para estudos de genética de populações por apresentarem variação no nível

populacional, por terem uma metodologia padronizada e apresentarem resultados confiáveis.

Embora o SSU rDNA seja amplamente empregado em análises filogenéticas de espécies da ordem Bangiales, ele é muito conservado para análises populacionais, apresentando identidade de 100% entre isolados da mesma espécie (Oliveira 1993; Oliveira & Ragan 1994; Kunimoto *et al.* 1999a). No entanto, o intron que ocorre neste gene tem sido utilizado como marcador molecular para identificação de linhagens de *Porphyra* (Oliveira & Ragan 1994; Kunimoto *et al.* 1999b; Kunimoto *et al.* 2003).

Neste trabalho pretendemos delimitar algumas populações de *Porphyra Spiralis* var. *Amplifolia* que ocorrem nas costas sul e sudeste do Brasil, utilizando os polimorfismos de tamanho dos introns S1506 que ocorrem no SSU rDNA desta espécie como marcador populacional. Na tentativa de desenvolver outros marcadores para *Porphyra* no nível populacional, foram analisadas também outras regiões variáveis do genoma nuclear (ITS-1 e 2) do cloroplasto (espaçador *rbcL-S*) e da mitocôndria (espaçador *cox2-3*).

Material e Métodos

1. Obtenção das amostras de *Porphyra*

Isolados de *PSA* foram coletados em oito locais das costas sul e sudeste do litoral brasileiro (Tabela 4.1). Para cada local foram coletados no mínimo 12 isolados. Os talos gametofíticos foram identificados de acordo com a descrição morfológica em Oliveira & Coll (1975). Com o auxílio da lupa, o material foi limpo e triado para remoção de epífitas e posteriormente preservado em sílica gel. Exemplares de cada população foram depositados no Herbário Ficológico (SPF) do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

2. Extração de DNA

As algas foram maceradas em nitrogênio líquido para a lise de tecidos e células. A extração de DNA foi feita com o “kit” de extração “Dneasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Santa Clarita, EUA), de acordo com o protocolo do fornecedor. Após a extração, o DNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com

brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989) para averiguação da qualidade e quantidade de DNA extraído.

Tabela 4.1. Informação de coleta para as populações de *P. spiralis* var. *amplifolia*.

População	Local de Coleta	Coletor	Data	Voucher
PSA-A ¹	Ponta da Armação, Florianópolis, SC	E.C. Oliveira	Nov 1997	SPF 56181
PSA-B ²	Fortaleza, Ubatuba, SP	M.C. Oliveira	Out 1990	-
PSA-C ¹	Baleia, São Sebastião, SP	D. Milstein	Ago 2002	SPF 56183
PSA-D ²	Cebimar, São Sebastião, SP	M.C. Oliveira	Out 1990	-
PSA-G ¹	Tijucopava, Guarujá, SP	D. Milstein	Jul 2002	SPF 56185
PSA-I ¹	Cibratel, Itanhaém, SP	M.C. Oliveira	Ago 1997	SPF 56186
PSA-L ¹	Lagoinha, Florianópolis, SC	E.C. Oliveira	Nov 1997	SPF 56187
PSA-R ²	Ilha do Cardoso, SP	E. J. Paula	Ago 1989	-
PSA-S ¹	Forte Itaipu, Santos, SP	E.C. Oliveira	Ago 1997	SPF 56189
PSA-T ¹	Tombo, Guarujá, SP	D. Milstein	Jul 2002	SPF 56180
PSA-V ¹	Vermelha do Norte, Ubatuba, SP	M.C. Oliveira	Ago 1998	SPF 56191

Isolados coletados: ¹ neste trabalho, ² Oliveira & Ragan (1994)

3. Amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Os “primers” utilizados nas PCR e reações de seqüenciamento estão listados na Tabela 4.2. Os “primers” 1400F e 18S3’ foram utilizados para a amplificação do intron. Para confirmarmos a presença das variantes de tamanho dos introns no SSU rDNA, essas regiões também foram amplificadas com os “primers” 1400F (SSU rDNA) e iR2 (intron). Os “primers” F993 e RBCS3’R foram utilizados para a amplificação do espaçador *rbcL*-S. Para a amplificação do espaçador *cox2-3*, foram utilizados os “primers” COX 2F e COX 3R. As condições de amplificação para um volume final de 50 µL foram: 1X tampão de PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada “primer”, aproximadamente 2 ng de DNA e 1.25U de *Taq* DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, EUA). Todas as reações de PCR foram feitas na termocicladora MiniCycler (MJ Research, Watertown, EUA). Os ciclos da PCR variaram de acordo com a região a ser amplificada, conforme segue:

- Intron e ITS - 94°C por 4 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min; e a extensão final a 72°C por 7 min.
- Espaçador *rbcL-S* - 94°C por 4 min; 35 ciclos a 94°C por 1 min, 42°C por 1 min, 72°C por 1 min e 30 seg; e a extensão final a 72°C por 10 min.
- Espaçador *cox2-3* - 94°C por 4 min; 5 ciclos a 93°C por 1 min, 45°C por 1 min, 72°C por 1 min; seguido por 30 ciclos a 93°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg; e a extensão final a 72°C por 5 min.

Tabela 4.2. “Primers” usados para amplificação e seqüenciamento do intron. “Primers” obtidos ou modificados de: (a) Sogin 1990 (b) Oliveira & Ragan 1994 (c) Zuccarello *et al.* 1999b (d) Freshwater *et al.* 1994 (e) Milstein & Oliveira 2005 (f) Bellorin *et al.* 2002.

“Primers”	Seqüências	Posição em <i>PSA</i>
1400F (b)	5'-TGTACACACCGCCCGTC-3'	SSU rDNA (1659)
iF-1 (b)	5'-ACAAGGTTTCCGAAAGGG-3'	Intron (1798)
iR-3 (b)	5'-TTAATGTCGTGACCGCGCA-3'	Intron (2306)
iF-2 (b)	5'-AAGTCGCTTTTGTGGC-3'	Intron (2382)
iR-2 (b)	5'-TTCGGACTGACTGCGTCG-3'	Intron (2461)
iF-3 (b)	5'-CGCTGGATGGTAATAAGGTG-3'	Intron (2580)
iR-1 (b)	5'-GACTCTGCTTTCGCAG-3'	Intron (2730)
18S3' (a)	5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA-3'	SSU rDNA (2860)
COX 2F (c)	5'-GTACCWTCTTTDRGRRKDAAATGTGATGC-3'	<i>cox2-3</i> (1)
COX 3R (c)	5'-GGATCTACWAGATGRAAWGGATGTC-3'	<i>cox2-3</i> (433)
F993 (d)	5'-GGTACTGTTGTAGGTAAATTWGAAGG-3'	<i>rbcL-S</i> (1)
RBCS3'R (d)	5'-GTTCTTGTGTTAATCTCAC-3'	<i>rbcL-S</i> (571)
18S3'F (e)	5'-TAGGTGAACCTGCGGAAGGAT-3'	ITS
5.8SF (e)	5'-GATACAACCTTAGCG-3'	ITS
5.8SR (e)	5'-CGCTAAGAGTTGTATC-3'	ITS
28S5'R (f)	5'-ATATGCTTAARTTCAGCGGGT-3'	ITS

Após a reação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989) para checagem do tamanho e quantidade de DNA amplificado. Para garantir a pureza dos reagentes nas PCR, foram feitos controles negativos com todos os reagentes menos o DNA. Para minimizar eventuais erros de incorporação de bases durante a PCR, no mínimo

três reações independentes foram reunidas antes do material ser seqüenciado (Baldwin *et al.* 1995). Os produtos da PCR foram purificados em colunas MicroSpin™ S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA) e foram diretamente seqüenciados.

4. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi feito com aproximadamente 40 ng de produto de PCR purificado, 3.2 pmol de “primer” e o “kit” de seqüenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os “primers” que foram utilizados estão listados na Tabela 4.2.

As reações de amplificação foram feitas na termocicladora MiniCycler (MJ Research), com 40 ciclos a 96°C por 10 seg, 54°C por 20 seg e 60°C por 4 min. Os produtos da PCR contendo os ddNTPs marcados foram precipitados em isopropanol 75% e lavados em etanol 70%, para a remoção de resíduos não incorporados. As amostras foram seqüenciadas nos seqüenciadores automáticos ABI PRISM™ 310 ou ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas nas direções direta e reversa foram manualmente alinhadas no programa ESEE 3.2 (Cabot & Beckenbach 1989) para a geração de uma seqüência consenso para cada amostra. Quando houve divergência entre nucleotídeos das diferentes seqüências obtidas para uma mesma posição em um indivíduo, os cromatogramas das seqüências foram analisados para confirmar os resultados. As seqüências consenso foram identificadas por comparação com seqüências disponíveis no GenBank através do programa BLASTN (Altschul *et al.* 1990).

Resultados

O intron S1506 foi amplificado por PCR para dez isolados por população e seqüenciado para os dez isolados das populações *PSA-S*, *PSA-T* e *PSA-V* e para dois isolados das demais populações. Dados de seqüenciamento dos isolados *PSA-B*, *PSA-D* e *PSA-R* foram obtidos de Oliveira & Ragan (1994). Foram identificados cinco tipos de polimorfismos de tamanho para o intron S1506, em um total de oito

populações de *PSA* analisadas e mais os três isolados seqüenciados por Oliveira & Ragan (1994), conforme especificado na Tabela 4.3. Os polimorfismos de tamanho foram nomeados de acordo com o tamanho do intron, começando pelo Tipo 1 para o intron de menor tamanho (616 pb) até Tipo 5 para o intron de maior tamanho (1056 pb). A presença de dois introns de tamanhos diferentes ocorrendo em um único isolado foi observada para um isolado da população *PSA-S* e para um isolado da população *PSA-T*.

Tabela 4.3. Polimorfismo de tamanho do intron S1506 encontrado nas diferentes populações de *P. spiralis* var. *amplifolia* (*PSA*). X + Y – ocorrência de introns de tamanhos diferentes no mesmo isolado.

População	Alelo	Tamanho do Intron	Latitude (S) Longitude (O)	Local de Coleta
<i>PSA-V</i>	Tipo 1	616 pb	23°25'S / 45°02'O	Ubatuba, SP
<i>PSA-B</i>	Tipo 2	744 pb ¹	23°32'S / 45°10'O	Ubatuba, SP
<i>PSA-C</i>	Tipo 3	791 pb	23°47'S / 45°40'O	São Sebastião, SP
<i>PSA-G</i>	Tipo 3	792 pb	23°54'S / 46°09'O	Guarujá, SP
<i>PSA-D</i>	Tipo 4	909 pb ¹	23°46'S / 45°24'O	São Sebastião, SP
<i>PSA-R</i>	Tipo 5	1055 pb ¹	25°04'S / 47°55'O	Ilha do Cardoso, SP
<i>PSA-A</i>	Tipo 5	1056 pb	27°46'S / 48°30'O	Florianópolis, SC
<i>PSA-L</i>	Tipo 5	1055 pb	27°47'S / 48°29'O	Florianópolis, SC
<i>PSA-I</i>	Tipo 5	1056 pb	24°12'S / 46°48'O	Itanhaém, SP
<i>PSA-S</i>	Tipo 3	792 pb	23°60'S / 46°19'O	Santos, SP
	Tipo 4	909 pb		
	Tipo 3+4	792 + 909 pb		
	Tipo 5	1055 pb		
<i>PSA-T</i>	Tipo 3	792 pb	24°02'S / 46°17'O	Guarujá, SP
	Tipo 4	909 pb		
	Tipo 5	1055 pb		
	Tipo 3+5	792 + 1055 pb		

Dados obtidos de: ¹ Oliveira & Ragan (1994), ² Haugen *et al.* (1999)

Foram amplificadas por PCR a região do ITS (ITS-1, 5.8S e ITS-2) de 10 isolados de *PSA-T* e *PSA-V*, e de cinco isolados das populações *PSA-A*, *PSA-C*, *PSA-G*, *PSA-I*, *PSA-L* e *PSA-S*, para análise comparativa com os resultados obtidos dos introns. O tamanho dos produtos de PCR, aproximadamente de 1000 pb, verificado em gel de agarose 0,7% foi o mesmo para todos os isolados de uma mesma população, como também entre os isolados das diferentes populações. Portanto, não foram encontrados polimorfismos de tamanho para variantes de tamanho do ITS, como foi encontrado para os introns.

Embora o tamanho do ITS tenha sido igual entre todos os isolados, foram seqüenciados os ITSs dos dez isolados das populações *PSA-T* e *PSA-V*, e de 1 isolados das populações *PSA-A*, *PSA-C*, *PSA-G*, *PSA-I*, *PSA-L* e *PSA-S* em uma tentativa de se encontrar polimorfismos entre as seqüências das diferentes populações.

A qualidade das seqüências do ITS não foi boa, conforme já observado anteriormente para o seqüenciamento do ITS de *P. spiralis* var. *amplifolia* (Milstein 2002), dificultando uma análise confiável no nível intra-específico. Devido à dificuldade metodológica de se trabalhar com esse marcador, optamos por outros marcadores que pudessem apresentar polimorfismo entre as populações, o espaçador *cox2-3* e o espaçador *rbcL-S*.

O espaçador *cox2-3* foi amplificado por PCR e seqüenciado para cinco isolados de cada população de *PSA* analisada neste trabalho (Tabela 4.1). O tamanho da região seqüenciada foi o mesmo para todos os isolados, 457 pb (região 3' do gene *cox2* + espaçador *cox2-3* + região 5' do gene *cox3*). O espaçador *cox2-3* de todos os isolados apresentou 167 pb. Foram observados cinco haplótipos distintos do espaçador *cox 2-3* para os 40 isolados de *PSA* estudados. Os cinco haplótipos diferem entre si por apenas um nt (exceto o isolado I-7 que difere dos demais em 2 nt), que estão localizados em posições diferentes (Anexo 4.A). A divergência entre as seqüências dos haplótipos variou de 0,2% a 0,7%. Todos os isolados analisados das populações *PSA-A*, *PSA-C*, *PSA-G* e *PSA-T* apresentaram o haplótipo A, os isolados da população *PSA-V* apresentaram o haplótipo A e o haplótipo B, os isolados de *PSA-L* apresentaram o haplótipo C, os isolados de *PSA-S* apresentaram os haplótipos A e D e os isolados de *PSA-I* apresentaram os haplótipos A e E (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Número de isolados de cada população de *PSA* com os haplótipos do espaçador *cox 2-3* correspondentes. Hapl – haplótipo.

	<i>PSA-A</i>	<i>PSA-C</i>	<i>PSA-G</i>	<i>PSA-I</i>	<i>PSA-L</i>	<i>PSA-S</i>	<i>PSA-T</i>	<i>PSA-V</i>
Hapl A	5	5	5	4	-	4	5	2
Hapl B	-	-	-	-	-	-	-	3
Hapl C	-	-	-	-	5	-	-	-
Hapl D	-	-	-	-	-	1	-	-
Hapl E	-	-	-	1	-	-	-	-

O espaçador *rbcL-S* foi amplificado por PCR e seqüenciado para 5 isolados de *PSA-S*, *PSA-T* e *PSA-V* e 2 isolados das demais populações. O tamanho da região seqüenciada foi o mesmo para todos os isolados, 570 pb (região 3' do gene *rbcL* + espaçador *rbcL-S* + região 5' do gene *rbcS*). O espaçador *rbcL-S* de todos os isolados seqüenciados tem 77 pb. Foi observado um único haplótipo para os 25 isolados de *PSA* analisados (Anexo 4.B) isto é, 100% de identidade entre os isolados de uma mesma população e entre os isolados das diferentes populações.

Discussão

Na tentativa de procurar por marcadores moleculares adequados para estudos populacionais do gênero *Porphyra*, foram analisados os espaçadores *cox2-3* e *rbcL-S*, comumente utilizados para análises populacionais em outras espécies de Rhodophyta.

Embora os marcadores mitocondriais sejam amplamente empregados em estudos de genética de populações e filogeografia em animais (Avice 1994), sua utilização em plantas e algas tem sido dificultada pela ausência de marcadores altamente variáveis. O DNA mitocondrial de plantas apresenta uma baixa taxa de mutação (Palmer & Herbon 1988). Entretanto, a utilização de regiões não codificantes do genoma mitocondrial com taxas de mutação mais elevadas, podem ser usadas nos estudos populacionais de algas (Zuccarello *et al.* 1999b).

Zuccarello *et al.* (1999b) e Zuccarello & West (2002) notaram que o espaçador *cox2-3* apresenta boa resolução como marcador populacional devido à sua alta taxa de mutação. Zuccarello *et al.* (1999b) descreveram o espaçador *cox2-3* como um marcador em potencial para genética de populações e estudos demográficos de Rhodophyta. Detectaram variabilidade na seqüência de DNA do espaçador *cox2-3* dentro de uma população de mangue de *Caloglossa leprieurii*, e em diferentes isolados da espécie *Bostrychia moritziana*. Marston & Bohnsack (2002) investigaram a variabilidade do espaçador *cox2-3* entre isolados de *Grateloupia doryphora* do Atlântico Norte e do Pacífico Norte, e encontraram uma pequena divergência de 0,3% a 0,6% entre os diferentes haplótipos. Chiasson *et al.* (2003) encontraram de 0,3% a 6,5% de divergência entre as

seqüências de diferentes haplótipos do espaçador *cox2-3*, descritos para isolados da América do Norte da alga vermelha *Batrachospermum helminthosum*.

Neste trabalho, a divergência entre as seqüências dos haplótipos do espaçador *cox2-3* foi de 0,2% a 0,7% para 40 isolados de *PSA*. Esses dados estão dentro do esperado quando comparados com os dados de outras populações de Rhodophyta descritas acima. No entanto, a distribuição dos haplótipos não foi exclusiva para diferentes populações. Os haplótipos das populações *PSA-A*, *PSA-C*, *PSA-G* e *PSA-T* (haplótipo A) e da população *PSA-L* (haplótipo C) não variaram no nível intra-populacional. No entanto, os haplótipos das populações *PSA-V* (haplótipo A e B), *PSA-S* (haplótipo A e D) e *PSA-I* (haplótipo A e E) variaram dentro da população. Um maior número de indivíduos teria que ser seqüenciado por população, para se chegar a um resultado conclusivo sobre a utilização do espaçador *cox2-3* como marcador populacional para *Porphyra*.

O espaçador *rbcL-S* tem sido empregado no estudo das relações entre populações, isolados e espécies de Rhodophyta (Destombe & Douglas 1991; Maggs *et al.* 1992; Goff *et al.* 1994; Zuccarello *et al.* 1999a, Zuccarello & West 2002, Cohen *et al.* 2004, Kamiya 2004), apresentando altas taxas de divergência entre espécies de *Gracilaria* proximamente relacionadas (13-18%; Destombe & Douglas 1991), entre isolados do complexo *Gymnogongrus* (12,5-13,4%; Maggs *et al.* 1992) e entre as espécies *Gracilaria* e *Gracilariopsis* (18%-25%; Goff *et al.* 1994). Zuccarello *et al.* (1999a) descreveram pouca divergência entre as seqüências dos espaçadores para isolados de uma mesma população de *Caloglossa leprieurii*, enquanto que Kamiya (2004) inferiu filogenia de isolados de diferentes localidades do complexo *Caloglossa leprieurii*.

Em estudos populacionais de Bangiales, Woolcott & King (1998) e Müller *et al.* (1998) encontraram variabilidade entre as seqüências do espaçador *rbcL-S* de diferentes populações de *Bangia* (0-27%) similar à descrita para *Gracilaria* e *Gracilariopsis* (Goff *et al.* 1994). Apesar das altas taxas de divergência, não foi possível definir as relações entre as diferentes populações de *Bangia* devido ao fato de haverem poucos caracteres filogeneticamente informativos e ocorrência de homoplasias (Müller *et al.* 1998).

Brodie *et al.* (1996, 1998), seqüenciaram o espaçador *rbcL-S* para distinguir diferentes espécies de *Porphyra* da Costa da Inglaterra. Não

foi encontrada variabilidade dentro de uma mesma espécie, mas foi possível separar as diferentes espécies. Niwa *et al.* (2005) seqüenciaram o espaçador *rbcL-S* de isolados de duas espécies de *Porphyra* proximamente relacionadas, *P. tenera* e *P. yezoensis*. Não foi encontrada divergência dentro das espécies, mas foram encontradas 7 substituições entre as duas espécies.

Neste trabalho, as seqüências do espaçador *rbcL-S* são idênticas entre os indivíduos de uma mesma população, como também entre as diferentes populações de *PSA* analisadas, abrangendo a faixa da costa Brasileira que vai de Santa Catarina até o Norte do Estado de São Paulo.

O genoma do cloroplasto tem menores taxas de mutação no DNA do que o genoma mitocondrial (Avise 1994). Zuccarello *et al.* (1999b) e Zuccarello & West (2002) descreveram que o espaçador do *cox2-3* é um melhor marcador populacional do que o espaçador *rbcL-S*, devido as essas diferenças nas taxas de mutação entre os espaçadores. Um maior nível de polimorfismo foi descrito por Cohen *et al.* (2004) para o espaçador *cox2-3* em relação ao espaçador *rbcL-S*, para diferentes isolados de *Gracilaria chilensis*. Neste trabalho ocorreu o mesmo. Portanto, o espaçador *cox2-3* tende a ser cada vez mais utilizado como marcador, entre ou até dentro de populações, dependendo do organismo a ser estudado.

O ITS tem sido descrito como marcador populacional para alguns grupos de Rhodophyta (Vis & Sheath, 1997; Marston & Bohnsack, 2002) e já foi empregado para distinguir diferentes populações de *P. yezoensis* e *P. tenera* (Kunimoto *et al.* 1999b, 2003). Em *PSA*, a região do ITS-1 próxima ao 5.8S rDNA apresenta uma região de poli-A, o que impossibilita o seqüenciamento fidedigno dessa região. O ITS-2 apresenta uma região semelhante. De acordo com Baldwin *et al.* (1995), o seqüenciamento da região do ITS pode ser dificultado pelo pareamento das bases, que sob certas condições de reações formam estruturas secundárias, inerentes ao comportamento funcional dos transcritos destas seqüências, que podem interferir na atividade da *Taq* polimerase. Por essa razão, pudemos verificar apenas os resultados da PCR, isto é, que não ocorre polimorfismo de tamanhos nos ITSs das populações de *PSA*.

Isolados de *PSA* do litoral sul e sudeste do Brasil não apresentam variação morfológica nem polimorfismo no SSU rDNA (Oliveira & Ragan 1994, Kunimoto *et al.* 1999a) para a delimitação de

populações. No entanto, verificamos que os introns S1506 que ocorrem no SSU rDNA de *PSA*, apresentam polimorfismos de tamanho nas diferentes populações (Tabela 4.4).

Os polimorfismos de tamanho ocorreram devido a variações no tamanho de ORFs, que são pseudogenes de endonucleases de “homing” (HEG), inseridos nos introns S1506. Esses HEGs apresentam um ciclo, em que após invadir um elemento genético (nesse caso, um intron) o HEG se degenera e eventualmente é perdido de uma população (Capítulo 3).

Oliveira & Ragan (1994) propuseram que os isolados com os maiores tamanhos de introns teriam originado os isolados com os menores tamanhos, e que poderia haver um padrão de colonização de populações de *PSA* no litoral das regiões sul e sudeste do Brasil. A colonização teria se iniciado em regiões de águas mais frias ao sul por populações com os introns maiores, e durante a migração para regiões mais ao norte, ocorreria a deleção progressiva do HEG do intron. Isso foi corroborado pelos nossos dados, pois os HEGs maiores dão origem os HEGs menores que nada mais são do que pseudogenes em processo de degradação.

De acordo com a Figura 4.1, é possível verificar que os introns S1506 do Tipo 5 ocorrem em Santa Catarina e no Litoral Sul do Estado de São Paulo e os do Tipo 1 e 2 no Litoral Norte do Estado. Em um estudo recente da flora de *Bangia* da Nova Zelândia, Broom *et al.* (2004) descreveram a ocorrência de isolados de *Bangia* considerados basais, e levantam a hipótese de que o hemisfério Sul não é apenas um centro de diversidade, mas um centro de origem para as *Bangiales* modernas. Se essas hipóteses estiverem corretas, então a colonização de *PSA* no litoral do Brasil começou a partir do sul.

Foram encontrados polimorfismos para o tamanho dos introns ocorrendo dentro das populações *PSA-S* e *PSA-T*. Isto poderia ser explicado se considerarmos que isolados de diferentes populações poderiam habitar uma mesma região. Isolados da população *PSA-S* foram coletados em Santos que é uma região portuária, portanto isolados de diferentes populações poderiam ser trazidos em cascos de navios, colonizando esta área. Isolados da população *PSA-T* foram coletados no Guarujá, uma ilha localizada a 13 km de Santos, portanto esta região estaria sujeita a influência portuária de Santos como também a atividades turísticas. Embora a população *PSA-G* também

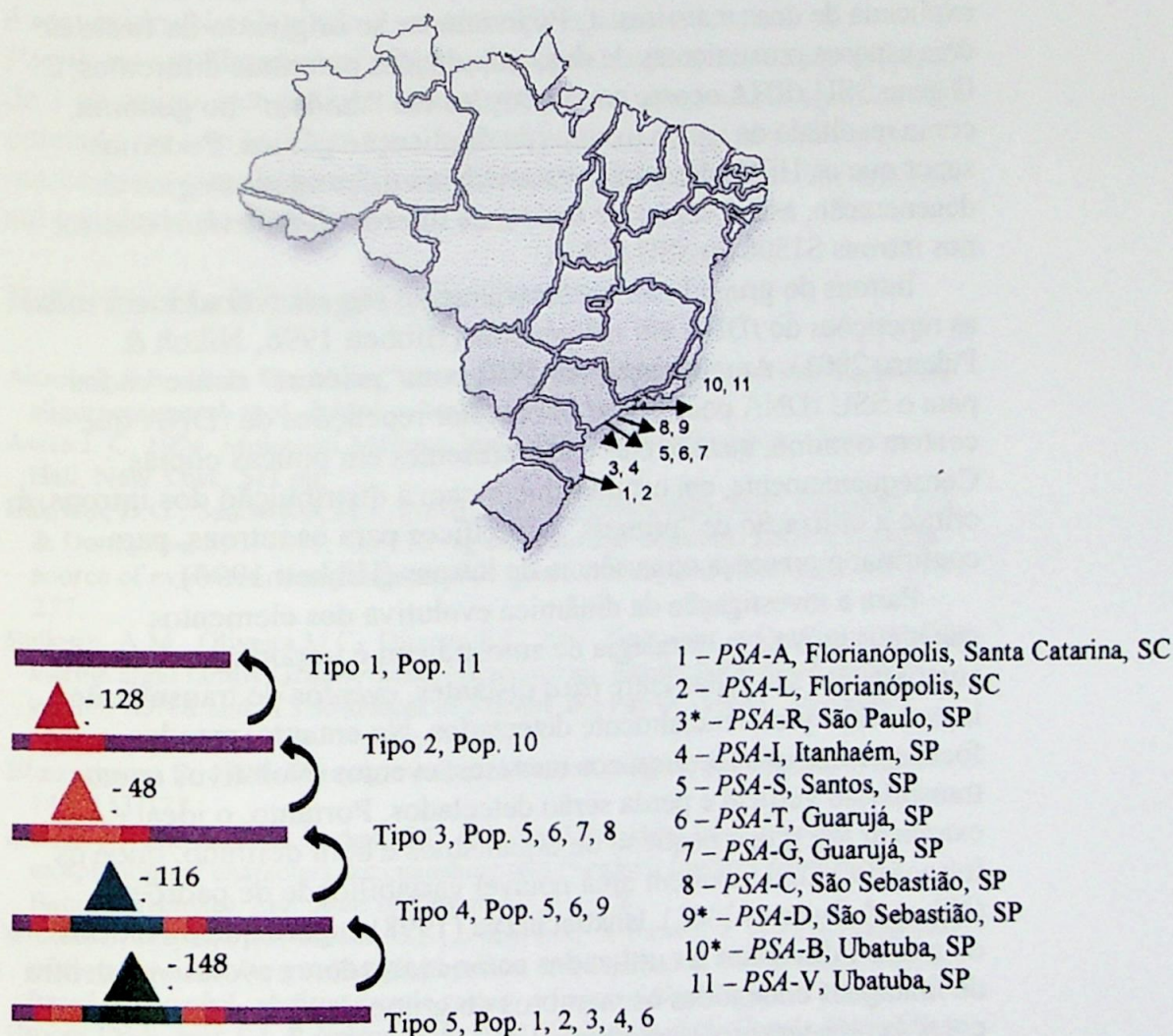


Figura 4.1. Mapa do Brasil com os sítios de coleta de PSA e esquema dos polimorfismos de tamanho dos introns S1506 de PSA. Cada triângulo representa a região do HEG que foi perdida nos diferentes tipos, com o número equivalente de bases ao lado. Pop. – população, * - Oliveira & Ragan (1994)

tenha sido coletada no Guarujá, a praia de Tijucopava se localiza do outro lado da Ilha, uma região mais distante de Santos.

A presença de dois introns de tamanhos diferentes ocorrendo em um único isolado das populações *PSA-V* e *PSA-T* poderia ser explicada de duas maneiras: 1. Poderiam ter se originado da fusão de dois esporos provenientes de duas populações parentais diferentes; 2. O gene SSU rRNA ocorre em repetições em “tandem” no genoma, como resultado de vários eventos de duplicação gênica. Podemos supor que os HEGs das cópias estariam em diferentes estágios de degeneração, assim cópias de tamanhos diferentes poderiam ocorrer nos introns S1506 do SSU rDNA.

Introns do grupo I não necessariamente são encontrados em todas as repetições do rDNA em um genoma (Hibbett 1996, Nikoh & Fukatsu 2001). Amplificação por PCR com “primers” conservados para o SSU rDNA pode falhar em revelar repetições de rDNA que contem o intron, quando eles estão presentes em poucas cópias. Conseqüentemente, em estudos que focam a distribuição dos introns, é crítica a utilização de “primers” específicos para os introns, para confirmar a presença ou ausência de introns (Hibbett 1996).

Para a investigação da dinâmica evolutiva dos elementos genéticos móveis, a estratégia de amostragem é importante. Quando comparações são feitas entre *taxa* distantes, eventos de transmissão lateral serão preferencialmente detectados. No entanto, estudos focados em níveis hierárquicos menores, eventos evolutivos como transmissão vertical e perda serão detectados. Portanto, o ideal é examinar um grupo pequeno de organismos e bem definido, onde os introns do grupo I exibem uma notável variabilidade de padrões (Nikoh & Fukatsu 2001). Bhattacharya (1998) sugere que os introns do grupo I deveriam ser utilizados como marcadores evolutivos dentro de linhagens onde todos os membros do grupo tenham o intron, pois essas seqüências oferecem uma relativa divergência para resolver relações evolutivas entre *taxa* proximamente relacionados.

Pudemos concluir que o polimorfismo de tamanho dos introns foi o único marcador populacional condizente com a distribuição geográfica encontrado para *PSA* dentre os marcadores estudados. Os demais marcadores são conservados para o grupo o que pode indicar que a separação das populações seja recente. Com os diferentes tamanhos dos introns é possível separar isolados de diferentes populações e indicar a região de procedência geográfica do material.

O fato deste marcador populacional ser um polimorfismo de tamanho facilita a detecção do marcador molecular pois requer apenas amplificação do intron por PCR. Já para uma abordagem mais detalhada, o seqüenciamento do intron (ou apenas da região do HEG) é requerido. No Capítulo 2, o intron da espécie coletada como *Porphyra* sp. "Itanhaém", foi seqüenciado e apresentou uma inserção de 3 pb única, que já tinha sido seqüenciado para outro isolado de *PSA* coletado na região. Com isso, poderemos usar o intron e HEG como marcadores populacionais para diferentes populações de *PSA* da costa sul e sudeste do Brasil.

Referências Bibliográficas

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Molecular Biology* 215: 403-410.
- Avise J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York, 511 pp.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. & Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Bellorin, A.M., Oliveira M.C., Oliveira E.C. 2002. Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on small subunit rDNA and ITS sequences of Atlantic and Pacific species. *Journal of Phycology* 38: 551-563.
- Bhattacharya D. 1998. The origin and evolution of protist group I introns. *Protist* 149: 113-122.
- Brodie, J., Hayes, P.K., Barker, G.L. & Irvine, L.M. 1996. Molecular and morphological characters distinguishing two *Porphyra* species (Rhodophyta: Bangiophycidae). *Eur. Jour. of Phycol.* 31: 303-308.
- Brodie, J., Hayes, P.K., Barker, G.L., Irvine, L.M. & Bartsch, I. 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophycidae, Rhodophyta) in the Northeast Atlantic based on the *rbcL-rbcS* intergenic spacer. *Journal of Phycology*. 34: 1069-1074.
- Broom J.E.S, Farr T.J. & Nelson W.A. 2004. Phylogeny of the *Bangia* flora of New Zealand suggest a southern origin for *Porphyra* and *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta). *Mol. Phyl. Evol.* 31:1197-1207.
- Cabot, E. L. & Beckenbach, A. T. 1989. Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Comput. Appl. Biosci.* 5:233-4.
- Chiasson, W.B., Machesky & Vis, M. L. 2003. Phylogeography of a freshwater red algae *Batrachospermum helminthosum* in North America. *Phycologia* 42 (6): 654-660.
- Cohen S., Faugeron S., Martinez E.A., Correa J.A., Viard F., Destombe C. & Valero M. 2004. Molecular identification of two sibling species under the name

- Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariiales). *Journal of phycology* 40: 742-747.
- Destombe C. & Douglas S.E. 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga: a technique for discrimination of closely related species. *Current Genetics* 19: 395-8.
- Donaldson D., Chopin A. & Saunders S. 2000. An assessment of the AFLP method for investigating population structure in the red alga *Chondrus crispus*. *Journal of applied phycology* 12: 25-35.
- Faugeron S., Valero M., Destombe C., Martinez E. A. & Correa J. A. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 37: 705-716.
- Freshwater D.W., Fredericq S., Butler B.S., Hommersand M.H. & Chase M.W. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7281-7285.
- Goff L.J., Moon D.A. & Coleman A.W. 1994. Molecular delineation of species and species relationship in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariiales). *Journal of phycology* 30:521-537.
- Haugen P., Huss V.A.R., Nielsen H. & Johansen S. 1999. Complex group-I introns in nuclear SSU rDNA of red and green algae: evidence of homing-endonuclease pseudogenes in the Bangiophyceae. 36: 345-353.
- Hibbett D.S. 1996. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* 13:903-917
- Kamiya M. 2004. Speciation and biogeography of the *Caloglossa leprieurii* complex (Delesseriaceae, Rhodophyta). *Journal of Plant Research* 117: 421-428.
- Kunimoto, M., Kito, H., Yamamoto, Y., Cheney, D.P., Kaminishi, Y. & Mizukami, Y. 1999a. Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Applied Phycology* 11: 203-209.
- Kunimoto, M., Kito, H., Kaminishi, Y., Mizukami, Y. & Murase, N. 1999b. Molecular divergence of the SSU rRNA gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phyc.* 11: 211-216.
- Kunimoto, M., Kito, H., Mizukami, Y., Murase, N. & Levine, I. 2003. Molecular features of a defined genetic marker for the determination of the *Porphyra tenera* lineage. *Journal of applied phycology.* 15: 337-343.
- Lu T.T. & Williams S.L. 1994. Genetic diversity and genetic structure in the brown algae *Halidrys dioica* (Fucales: Cystoseiraceae) in southern California. *Mar. Biol.* 121: 363-371.
- Maggs C.A., Douglas S.E., Fenety J. & Bird C. J. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of phycology* 28: 214-232.
- Marston M. & Bohnsack M. V. 2002. Genetic variability and potential sources of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island waters (USA). 2002. *Journal of Phycology* 38: 649-658.

- Milstein, D. 2002. *Filogenia molecular de espécies de Porphyra (Bangiales, Rhodophyta) do Atlântico Sul*. Dissertação de Mestrado, Depto. de Botânica, IB-USP, pp. 82.
- Müller, K.M., Sheath, R.G., Vis, M.L., Crease, T.J. & Cole, K.M. 1998. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the RuBisCo spacer, *rbcL* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. 1. North America. *Phycologia* 37: 195-207.
- Nikoh, N. & Fukatsu, T. 2001. Evolutionary dynamics of multiple group I introns in the nuclear ribosomal RNA genes of the endoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Mol. Biol. Evol.* 18(9): 1631-1642.
- Niwa K., Kikuchi N. & Aruga Y. 2005. Morphological and molecular analyses of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 41: 294-304.
- Oliveira, E.C. & Coll, J. 1975. The genus *Porphyra* C. Ag. (Rhodophyta-Bangiales) in the American South Atlantic. I. Brazilian species. *Bot. Mar.* 18: 191-197.
- Oliveira, M.C. 1993. *Filogenia de Porphyra spp. (Rhodophyta): Sequenciamento do gene nuclear para o RNA da subunidade pequena do ribossomo (rDNA 18S) e estudos morfológicos da fase conchocelis*. Tese de Doutorado, Depto. Botânica, IB-USP, pp.160.
- Oliveira, M.C. & Ragan, M.A. 1994. Variant forms of a group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Mol. Biol. Evol.* 11:195-207.
- Palmer J.D. & Herbon L.A. 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution* 28: 87-97.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. 3 vol. Cold Spring Harbour Laboratories press, New York.
- Sogin, M.L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In Innes, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, pp. 307-314.
- Sosa P.A., Cabrera-Perez M. A. & Garcia-Reina G. 1996. Genetic variation of *Gracilaria cervicornes* (Rhodophyta) gametophytes from the Canary Islands. *Eur. J. Phycol.* 31: 143-147.
- Sosa P.A. & Lindstrom S.C. 1999. Isozymes in macroalgae (seaweeds): Genetic differentiation, genetic variability and applications in systematics. *Eur. J. Phycol.* 34: 427-442.
- Vis, M.L. & Sheath, R.G. 1997. Biogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America based on molecular and morphological data. *J. Phycol.* 33(3): 520-526.
- Vis, M.L. & Sheath, R.G. 1998. A molecular and morphological investigation of the relationship between *Batrachospermum spermatoinvolutrum* and *B. gelatinosum* (Batrachospermales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycology* 33:231-239.
- Wattier R., Dallas J.F., Destombe C., Saumitou-Laprade P. & Valero M. 1997. Single locus microsatellites in Gracilariales (Rhodophyta): High level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species. *Journal of Phycology* 33: 868-880.

- Woolcott G.W. & King R.J. 1998. *Porphyra* and *Bangia* (Bangiaceae, Rhodophyta) in warm temperate waters of eastern Australia: morphological and molecular analyses. *Phycological Research* 46, 111-123.
- Wright J.T., Zuccarello G.C. & Steinberg P.D. 2000. Genetic structure of the subtidal red alga *Delisea pulchra*. *Marine Biology* 136: 439-448.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 1997. Hybridization studies in *Bostrychia*. 2: Correlation of crossing data and plastid DNA sequence data within *B. radicans* and *B. moritziana* (Rhodophyta, Ceramiales). *Phycologia*. 36: 293-304.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 2002. Phylogeography of the *Bostrychia calliptera*-*B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41(1): 49-60.
- Zuccarello, G.C., Burger G., West, J. A. & King R. J. 1999a. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.
- Zuccarello, G.C., Burger G., West, J. A. & King R. J. 1999b. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.

ANEXO 4.A

Alinhamento de seqüências

Alinhamento de seqüências dos haplótipos (Hapl) do espaçador *cox2-3* de isolados das populações de *PSA*. A seqüência completa é dada apenas para o primeiro haplótipo. Posições idênticas são indicadas por pontos (.). Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As letras minúsculas indicam as seqüências dos “primers”. As letras minúsculas indicam as seqüências dos “primers”. A posição de número 198 indicada por asterisco (*) localiza o final do gene *cox2* e o início do espaçador e a posição de número 366 indicada por asterisco (*) localiza o final do espaçador e o início do gene *cox3*.


```

          10      20      30      40      50      60
Hapl A  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Hapl B  .....
Hapl C  .....
Hapl D  .....
Hapl E  .....

          70      80      90      100     110     120
Hapl A  TTTGTAAAACGTGAAGGCCTTTTTTATGGCCAGTGCAGTGAATTTGTGGCGTAAATCAT
Hapl B  .....
Hapl C  .....
Hapl D  .....
Hapl E  .....

          130     140     150     160     170     180
Hapl A  GGCTTTATGCCTATTGTTGTGGAAGCTGTGTCTTTGCCAAGTTACATTTCTTGAATAGCT
Hapl B  .....
Hapl C  .....
Hapl D  .....
Hapl E  .....G.....

          190     200     210     220     230     240
Hapl A  AATAAGCTAAGTGAATA*ATAAAAAATTGGTTTGTCCACTAATATTTTATGCGTATATC
Hapl B  .....*.....
Hapl C  .....*.....
Hapl D  .....*.....
Hapl E  .....*.....

          250     260     270     280     290     300
Hapl A  TTTAACTCAAATATTTTTTTTAGCTTTTTTTAGTCTTTTTTTTATTTTGACTAAATCCAAA
Hapl B  .....C.....
Hapl C  .....
Hapl D  .....
Hapl E  .....T.....

          310     320     330     340     350     360
Hapl A  ATATTTAACCTTACACAATACGATTTTTTAAAAAATTGAAAAAGCGCTCAAAATAAAAAATG
Hapl B  .....
Hapl C  .....
Hapl D  .....C.....
Hapl E  .....

          370     380     390     400     410     420
Hapl A  AGCGTA*TAATTACAAACTATTATGACAAATACTACAAATTTAAGTTTATAAAAAACAGC
Hapl B  .....*.....
Hapl C  .....*.....
Hapl D  .....*.....
Hapl E  .....*.....

          430     440     450
Hapl A  TAAACAATTGCAACgacatccwtttreatctwgtatgcc

```


Hapl B
Hapl C
Hapl D
Hapl E

ANEXO 4.B

Alinhamento de seqüências

Seqüência do haplótipo único (Hapl U) do espaçador *rbcL-S* de isolados das populações de *PSA*. Os números acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As letras minúsculas indicam as seqüências dos “primers”. A posição de número 475 indicada por asterisco (*) localiza o final do gene *rbcL* e o início do espaçador, e a posição de número 553 indicada por asterisco (*) localiza o final do espaçador e o início do gene *rbcS*.


```

      10      20      30      40      50      60
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      ggtactgttgtaggtaaatwgaaggAGATCCTTTAATGATTAAAGGTTTCTACAACACT

      70      80      90      100     110     120
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      TTACTTGAAAGTGAACAGACATTAATTTACCTCAAGGTTTATTC TTGCTCAAAACTGG

      130     140     150     160     170     180
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      GCATCTCTACGTAAAGTTGTCCAGTAGCATCTGGTGGTATTCATGCTGGTCAAATGCAC

      190     200     210     220     230     240
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      CAACTTC TTGATTATTTAGGTGATGATGTAGTTC TTCAATTTGGTGGTGGTACAATTGGA

      250     260     270     280     290     300
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      CATCC TGATGGTATCCAAGCGGGTGCAACTGCGAATAGAGTAGCATTTGGAGTCAATGGTT

      310     320     330     340     350     360
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      ATGGCAAGAAATGAGGGTCGTAATTATGTAGCAGAAGGTCCACAAATTTTAAGAGACGCT

      370     380     390     400     410     420
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      GCTAAAAC TTGTGGACCTTTACAAACAGCTTTGGACTTATGGAAAGACATTAGTTT TAAC

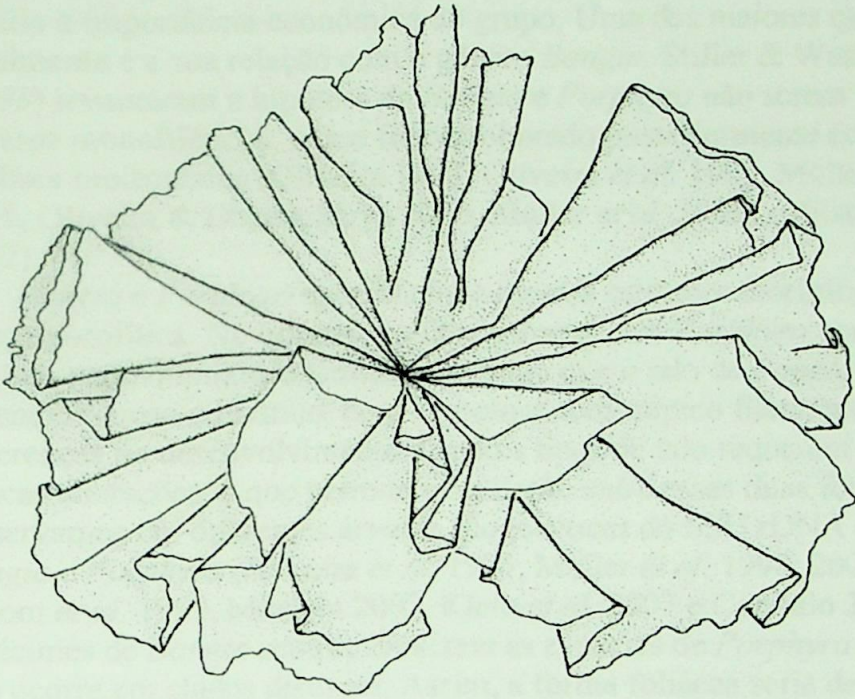
      430     440     450     460     470     480
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      TATACTTCCACAGATACAGCTGATTTTGTGAGACTCCAACAGCAAACATCTAG*TTTAA

      490     500     510     520     530     540
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      TGACTACTTGCTAATGCTTAATTTAGCAAATTTGTGAGGAAAATTAAC TTATAATAATAAG

      550     560     570
Hapl U  ....|....|....|....|....|....|..
      GAGCATAGAATA*gtgagattaacacaagaac

```


Capítulo 5



Considerações Finais

Considerações Finais

O gênero *Porphyra* tem sido alvo de muitos trabalhos científicos devido à importância econômica do grupo. Uma das maiores questões atualmente é a sua relação com o gênero *Bangia*. Stiller & Waaland (1993) levantaram a hipótese de *Bangia* e *Porphyra* não serem gêneros monofiléticos, o que foi corroborado posteriormente com análises moleculares (Oliveira 1993, Oliveira *et al.* 1995, Müller *et al.* 1998, Oliveira & Bhattacharya 2000, Müller *et al.* 2001a, Milstein 2002).

Bangia e *Porphyra* apresentam a mesma estrutura morfológica na fase esporofítica. No entanto, na fase gametofítica *Porphyra* apresenta um talo parenquimatoso laminar enquanto que o talo de *Bangia* é parenquimatoso cilíndrico, com aspecto macroscópico filamentosos. Diferenças no desenvolvimento dos dois tipos de talo requerem poucas alterações, o que permite a transição entre essas duas formas. Observamos em diferentes árvores filogenéticas do SSU rDNA de *Bangia* e *Porphyra* (Oliveira *et al.* 1995, Müller *et al.* 1998, 2003, Broom *et al.* 1999, Milstein 2002, Klein *et al.* 2003 e Capítulo 2) que espécimes de *Bangia* sempre enraízam as espécies de *Porphyra*, e que isso ocorre em clados distintos. Assim, a forma foliácea seria derivada da forma filamentosa e teria surgido em mais do que uma ocasião (Broom *et al.* 2004).

Análises filogenéticas com genes nucleares, do cloroplasto, e recentemente com introns do SSU rDNA (Müller *et al.* 2001a) confirmaram que *Bangia* e *Porphyra* não podem ser sustentados como grupos irmãos e monofiléticos. Em nossas análises *Porphyra* é um gênero polifilético e *Bangia* é parafilético. As espécies do gênero *Porphyra* não apresentam nas árvores do SSU rDNA um padrão de agrupamento de acordo com a origem geográfica. As únicas espécies que formaram um agrupamento monofilético de alto suporte foram as descritas apenas para o Brasil.

Porphyra é um gênero de morfologia simples, mas com um grande número de espécies descritas (Yoshida *et al.* 1997). Atualmente, descrições taxonômicas em parceria com marcadores moleculares estão redefinindo algumas classificações, isto é, espécies estão sendo colocadas em sinonímia, novas espécies e novas ocorrências estão sendo descritas. No Capítulo 2, foi descrita uma

nova espécie de *Porphyra* que foi coletada no litoral do Piauí, e novas ocorrências para a cosmopolita *P. suborbiculata* e para *P. rakiura*.

Bangia e *Porphyra* podem apresentar introns do grupo I no SSU rDNA (Oliveira & Ragan 1994, Müller 1998, Broom *et al.* 2002, Milstein & Oliveira 2005) e podem ser usadas como modelos experimentais para a pesquisa desses elementos móveis. Os polimorfismos de tamanho dos intron S1506 encontrado nas diferentes populações de *P. spiralis* var. *amplifolia* ocorreram devido à perda de partes de um domínio protéico, que por sua vez também é um elemento móvel, o HEG. Foi feita uma análise da dinâmica evolutiva dos HEGs a partir do estudo de grupos que exibiram variabilidade nesses genes. Nesse trabalho foi possível detectar eventos evolutivos como transmissão vertical dos HEGs dentro das populações de *PSA*, a partir de uma transmissão lateral para um ancestral de *PSA*. Além disso, foi possível verificar diferentes fases do ciclo do HEG, caracterizar o motivo His-Cys box para algumas populações e também verificar uma população onde ocorre perda de grandes regiões do HEG.

Concluimos também com os experimentos auto-processamento *in vitro*, que as variações no HEG não impedem os introns de manterem as suas atividades catalíticas, assim os introns são fenotipicamente silenciosos para o gene no qual estão inseridos e podem sobreviver em larga escala evolutiva.

Bhattacharya (1998) sugere que os introns do grupo I deveriam ser utilizados como marcadores evolutivos dentro de linhagens onde todos os membros do grupo tenham o intron, pois essas seqüências oferecem uma relativa divergência para resolver relações evolutivas entre *taxa* proximamente relacionados. Assim, os polimorfismos de tamanho dos introns S1506 foram utilizados como marcador populacional para *PSA*. Foram utilizados também outros marcadores moleculares como o espaçadores *rbcL-S* e *cox2-3*.

Não foram obtidos resultados significativos com a utilização dos espaçadores *rbcL-S* e *cox2-3*. No entanto, foi possível delimitar diferentes populações através do polimorfismo de tamanho dos introns. Essas análises permitiram corroborar a hipótese de colonização de *PSA* na costa brasileira proposta por Oliveira (1993). Portanto, os polimorfismos de tamanho dos introns S1506 que ocorrem em *PSA* podem ser uma ferramenta útil na identificação da origem desses espécimes, quando coletados na natureza.

A análise da diversidade molecular das espécies de *Porphyra* do Brasil, gerou dados para filogenia e biogeografia para o grupo, permitiu a obtenção de dados sobre a distribuição e o auto-processamento dos introns do grupo I e de suas HEGs, e, por fim, permitiu um visão, mesmo que limitada para regiões do genoma do núcleo, cloroplasto e mitocôndria.

Referências Bibliográficas

- Bhattacharya D. 1998. The origin and evolution of protist group I introns. *Protist* 149: 113-122.
- Broom, J.E., Jones, W.A., Hill, D.F., Knight, G.A. & Nelson, W.A. 1999. Species recognition in New Zealand *Porphyra* using 18S rDNA sequencing. *Journal of Applied Phycology* 11: 421-428.
- Broom J.E., Nelson W.A., Yarish C., Jones W.A, Aguilar Rosas R. & Aguilar Rosas L.E. 2002. A reassessment of the taxonomic status of *Porphyra suborbiculata*, *Porphyra carolinensis* and *Porphyra lilliputiana* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *European Journal of Phycology* 37: 227-235.
- Broom J.E.S, Farr T.J. & Nelson W.A. 2004. Phylogeny of the *Bangia* flora of New Zealand suggest a southern origin for *Porphyra* and *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta). *Mol. Phyl. Evol.* 31:1197-1207.
- Klein A.S., Mathieson A.C., Neefus C.D., Cain D.F., Taylor H.A., Teasdale B.W., West A.L., Herhe E.J., Brodie J., Yarish C. & Wallace A.L. 2003. Identification of north-western Atlantic *Porphyra* (Bangiaceae, Bangiales) based on sequence variation in nuclear SSU and plastid *rbcL* genes. *Phycologia* 42: 109-122.
- Milstein, D. 2002. *Filogenia molecular de espécies de Porphyra (Bangiales, Rhodophyta) do Atlântico Sul*. Dissertação de Mestrado, Depto. de Botânica, IB-USP, pp. 82.
- Milstein D. & Oliveira M. C. 2005. Molecular phylogeny of Bangiales (Rhodophyta) based on small subunit rDNA sequencing: Emphasis on Brazilian *Porphyra* species. *Phycologia* 44 (2): 212-221.
- Müller, K.M., Sheath, R.G., Vis, M.L., Crease, T.J. & Cole, K.M. 1998. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the RuBisCo spacer, *rbcL* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. 1. North America. *Phycologia* 37: 195-207.
- Müller K.M, Cannone J.J., Gutell R.R. & Sheath R.G. 2001a. A Structural and Phylogenetic Analysis of the Group IC1 Introns in the Order Bangiales (Rhodophyta). *Molecular Biology and Evolution* 18: 1654-1667.
- Müller K. M., Cole K. M. & Sheath R.G. 2003. Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in North America. II. Biogeographical trends in karyology: chromosome numbers and linkage with gene sequence phylogenetic trees. *Phycologia* 42 (3): 209-219.

- Oliveira, M.C. 1993. *Filogenia de Porphyra spp. (Rhodophyta): Seqüenciamento do gene nuclear para o RNA da subunidade pequena do ribossomo (rDNA 18S) e estudos morfológicos da fase conchocelis*. Tese de Doutorado, Depto. Botânica, IB-USP, pp. 160.
- Oliveira, M.C. & Ragan, M.A. 1994. Variant forms of a group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Mol. Biol. Evol.* 11:195-207.
- Oliveira, M.C. & Bhattacharya, D. 2000. Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. *American Journal of Botany* 87(4): 482-492.
- Oliveira M.C., Kurniawan J., Bird C.J., Rice E.L., Murphy C.A., Singh R.K., Gutell R.R. & Ragan M.A. 1995. A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiophycidae, Rhodophyta) based on sequences of the nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. *Phycological Research* 43: 71-79.
- Stiller, J.W. & Waaland, J.R. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 29(4): 506-517.
- Yoshida, T., Notoya, M., Kikuchi, N. & Miyata, M. 1997. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography. *Nat. Hist. Res. Special Issue* 3: 5-18.