

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOLOGIA

ANÁLISE FILOGENÉTICA MOLECULAR E MORFOLÓGICA – CONTRIBUIÇÃO PARA A BIODIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE MACROALGAS DOS GÊNEROS DICTYOTA E CANISTROCARPUS (DICTYOTACEAE - PHAEOPHYCEAE) DA COSTA BRASILEIRA

¹ Flavia Rivola Cvijak Garcia de Mattos (IC-UNIRIO), ¹ Erick Alves Pereira Lopes Filho (IC-voluntário), Roberta Pacheco Silva (IC-FAPERJ), ¹ Juliana Magalhães de Araujo (Mestrado-CAPE), ¹ Fabiano Salgueiro (Orientador), ¹ Joel Campos De Paula (Orientador).

1 – Departamento de Botânica; Instituto de Biociências; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: FAPERJ

Palavras chave: Biodiversidade; Sistemática; Dictyotaceae.

INTRODUÇÃO

O litoral brasileiro, devido a sua grande extensão e diversidade de ambientes, apresenta grande biodiversidade de organismos fotossintetizantes marinhos. As algas pardas são organismos quase exclusivamente deste ambiente com apenas seis espécies conhecidas em ambiente dulciaquícolas (De Reviere, 2006). Estas algas estão representadas no Atlântico americano por 175 espécies em 76 gêneros (Wynne, 2011), e 94 espécies em 48 gêneros em águas brasileiras (Széchy & De Paula, 2010). A família Dictyotaceae destaca-se em águas tropicais e subtropicais quentes, pelo número de espécies, de gêneros e pela biomassa que sustenta os ecossistemas bentônicos. Tradicionalmente as algas pardas dos gêneros Dictyota e Canistrocarpus são identificadas através de sua morfologia. Entretanto, a ferramenta morfológica sozinha, tem se mostrado insuficiente para a identificação dessas espécies, devido a presença de uma anatomia relativamente simples dessas algas e pela escassez de informações taxonômicas confiáveis. Aliada a essa morfologia simples, ainda contribuem para as dificuldades taxonômicas das espécies destes gêneros, a plasticidade fenotípica de cada grupo de espécies e em alguns casos a imprevisibilidade de ocorrência que pode dificultar o acompanhamento das variações morfológicas como resposta a mudanças ambientais. O uso de marcadores moleculares pode contribuir de forma efetiva ao conhecimento da diversidade biológica, suas relações evolutivas (filogenia) e dos próprios mecanismos envolvidos no processo evolutivo (Bucklin et al. 2010; Radulovici et al. 2010). A técnica de “DNA barcoding” pressupõe o uso da taxonomia tradicional vinculada a um espécime testemunho (denominado “voucher”) que será depositado em uma coleção biológica. Este espécime, tendo seus atributos morfológicos conhecidos e uma sequência de DNA marcadora desta entidade taxonômica, poderá então alimentar um banco de dados que venha a facilitar através de comparações das sequências a identificação das espécies do grupo estudado (Stoeckle, 2003). Quanto maior o banco de dados maior será sua eficácia em identificar novas sequências de organismos ainda não identificados e com maior confiabilidade. Esta técnica pode ainda prestar-se ao descobrimento e descrição de novas espécies, refletindo numa melhor compreensão da biodiversidade (Meyer & Paulay, 2005). O uso do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COX) tem sido sugerido, pois ele representa um “amplicon” que é encontrado universalmente e é capaz, na maioria dos casos, de conter divergências suficientes para separar espécies mesmo que proximamente relacionadas (Stoeckle, 2003; Saunders, 2005), possibilitando a elucidação taxonômica dentro do grupo estudado.

OBJETIVO

Identificar algas dos gêneros Dictyota e Canistrocarpus, através de inferências filogenéticas utilizando diferentes marcadores moleculares em conjunto com a análise morfológica, a fim de proporcionar uma melhor abordagem taxonômica para as espécies destes gêneros encontradas no Brasil.

METODOLOGIA

Coleta do Material Biológico: As algas foram coletadas através de mergulho livre ou autônomo através de busca ativa, com variação de 0 a 5 metros de profundidade. Os locais de coleta e por tanto, as amostras obtidas, foram georeferenciadas com o uso de GPS (Global Positioning System). Foram também registrados o ambiente de coleta, estado de conservação do local de coleta (unidade de conservação ou não), temperatura e salinidade da água nos locais de coleta e todos os demais dados relevantes. **Processamento das amostras:** As amostras foram triadas em campo a fim de retirar possíveis epífitas e identificar precisamente cada indivíduo confirmando assim a espécie amostrada. Cada indivíduo coletado foi previamente subdividido em duas partes, sendo as regiões apicais, normalmente mais livres de epífitas e com parede celular menos espessa, selecionadas para a análise molecular. Estas foram secas em papel absorvente, colocadas imediatamente em sílica gel e depois levadas ao freezer (-80°C). A parte restante das algas foi fixada em solução de formalina a 4% para posterior análise morfológica e herborização. Outros indivíduos da mesma população foram coletados e fixados para posterior identificação e confecção de exsiccatas que serão incluídas no acervo do herbário da UNIRIO. A identificação do material será baseada em abordagens atualizadas da taxonomia, com estudos detalhados dos caracteres morfológicos vegetativos e reprodutivos, contemplando especialmente aqueles que são diagnósticos para a identificação das espécies. **Extração e amplificação das sequências de DNA:** Os espécimes preservados em sílica gel e congelados (-80°C) foram macerados, com auxílio de macerador automático e esse material foi levado a extração de ácidos nucleicos seguindo o protocolo desenvolvido por De Clerck et al. (2001, 2006). Após a extração, o DNA total foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão tris-borato-EDTA e corado com brometo de etídeo, para averiguação da qualidade e quantidade de DNA extraído. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação através da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) usando-se iniciadores específicos e a inferência filogenética realizada baseou-se nas sequências geradas seguindo

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

os protocolos sugeridos por Draisma et al. (2001) e De Clerck et al. (2006). Após a PCR, os produtos serão analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, com marcador de tamanho (DNA Ladder - Gibco BRL) para verificar os tamanhos dos fragmentos amplificados. Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas: Os produtos obtidos a partir das PCRs foram purificados e sequenciados por uma empresa especializada prestadora de serviços (Macrogen, Inc: <http://macrogen.com>). As sequências obtidas nas direções direta e reversa para cada marcador foram montadas usando o programa Chromas2. As sequências consenso obtidas serão comparadas com as sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os alinhamentos serão realizados utilizando-se o Mega5 (Tamura et al., 2011). Os dados moleculares (depois de alinhados) servirão como base para a construção de árvores filogenéticas utilizando-se Máxima Parsimônia e Máxima Verossimilhança no programa Mega e inferência Bayesiana com o programa Mr. Bayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) será usado para determinar o melhor modelo de evolução. Como grupo externo será usada a espécie *Padina pavonica* (L.) Thivy in Taylor. As análises serão conduzidas seguindo, sobretudo as recomendações descritas em Bittner et al. (2008) e De Clerck et al. (2006).

RESULTADOS

Foram realizadas diversas campanhas de coleta, com o objetivo de encontrar espécies dos gêneros *Dictyota* e *Canistrocarpus*. No total, foram extraídas 183 amostras dentre as espécies *Dictyota cf. caribaea* Hörnig & Schnneter in Hörnig, Schnneter & Prud'homme van Reine, *D. ciliolata* Sonder ex Kützinger, *D. jamaicensis* Taylor (= *D. crenulata* J. Agardh), *D. menstrualis* (Hoty) Schnneter, Hörnig Weber-Peukert, *D. mertensii* (Martius) Kützinger, *Dictyota* sp., *Canistrocarpus cervicornis* (Kützinger) De Paula & De Clerck e *C. crispatus* (Kützinger) De Paula & De Clerck. Até o momento não se obteve sucesso no sequenciamento com o loco COX, embora tenhamos obtido amplificações aparentemente com qualidade para este procedimento. A primeira inferência filogenética com sequências geradas pelo presente projeto baseada no loco nad1 usando Máxima Verossimilhança como método analítico, está apresentada na Figura 1. *Dictyota jamaicensis* foi uma espécie descrita para o Caribe e Wysor & De Clerck (2003) sugeriram ser co-específica com *D. crenulata*, uma espécie descrita para o Oceano Pacífico. Ambas apresentam semelhanças morfológicas, sendo uma delas a presença de dentes na sua margem. Tronholm et al. (2010) demonstrou que populações do Caribe e do Pacífico não ficam em um mesmo clado e que portanto devem corresponder a táxons diferentes. Nossos dados corroboram esta idéia. Outra consideração relevante demonstrada na Figura 1 é a separação evidente entre os gêneros *Dictyota* e *Canistrocarpus* em dois grupos como proposto por De Clerck et al. (2006), e a inserção de um espécime analisado no presente trabalho e identificado como *Canistrocarpus cervicornis*, que está junto às outras sequências de algas do mesmo gênero e espécie. Utilizando-se nad1 o espécime brasileiro identificado como *Dictyota menstrualis* agregou-se em um clado fracamente suportado com *D. ciliolata*, que embora em termos de tamanho e padrão de ramificação assemelha-se à *D. menstrualis*, pode ser distinguida desta pela presença de denticulações marginais. Os resultados obtidos em uma segunda análise filogenética realizada a partir de sequências referentes ao loco rbcL, também suportam a separação dos gêneros *Dictyota* e *Canistrocarpus*, bem como a união do espécime brasileiro no clado contendo *C. cervicornis*. De forma semelhante, *D. jamaicensis* uniu-se a um espécime caribenho, identificado a priori como *D. crenulata*, e ambos mantiveram-se distantes das populações do Pacífico. Para este loco obteve-se a sequência para um espécime identificado como *D. cf. caribaea*, que se apresenta unificado à *D. menstrualis* em um clado fortemente suportado, lançando dúvidas sobre a identificação de *D. cf. caribaea* do presente estudo.

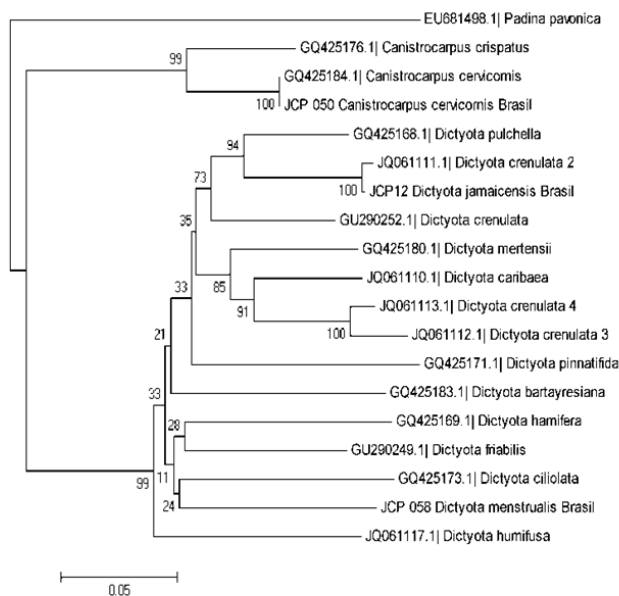


Figura 1 – Análise de Máxima Verossimilhança utilizando-se o loco nad1. Os valores apresentados nos nós correspondem aos valores de *Bootstrap*.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

CONCLUSÃO

O projeto alcançou sucesso na discriminação das espécies amplificadas utilizando-se o *loco nad1* o que corrobora dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em relação ao *loco rbcL*. A espécie *C. cervicornis* é distinguível da outra entidade do mesmo gênero *C. crispatus*, o que valida as características morfológicas tradicionalmente utilizadas para a distinção das duas espécies (forma do ápice, presença de proliferações submarginais, soros de esporângios). O táxon comumente identificado como *D. jamaicensis* (*D. crenulata*) deve corresponder ao táxon recém-criado *D. canariensis* (Grunow) Tronholm (Tronholm et al. 2013), o que indica que esses espécimes identificados como *Dictyota crenulata* e *D. cf. caribaea* para a costa brasileira devem ser reavaliados. Há necessidade de ampliar o número de locos para que se possa conhecer melhor a biodiversidade das algas brasileiras e contribuir efetivamente para a sistemática da ordem Dictyotales.

REFERÊNCIAS

- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Bucklin A., D. Steinke, L. Blanco-Bercial (2010). DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Ann. Rev. Mar. Sci.* De Paula, J. C. et al. 2001.
- De Clerck, O., Leliaert, F., Verbruggen, H., Lane, C. E., De Paula, J. C., Payo, D. A. & Coppejans, E. (2006). A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbcL* and 26S ribosomal DNA sequence analyses. *J. Phycol.* 42: 1271-1288.
- De Revers, B. (2006). *Biologia e Filogenia das Algas*. Tradução Iara Maria Franceschini – Porto Alegre: Artmed, 280pp.
- Draisma, S. G. A., Prud'homme van Reine, W. F., Stam, W. T., & Olsen, J. L. (2001). A reassessment of phylogenetic relationships within the Phaeophyceae based on RuBisCo large subunit and ribosomal DNA sequences. *J. Phycol.* 37: 586-605.
- Kumar S., Dudley J., Nei M. & Tamura K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Meyer, C.P. & G. Paulay (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3: 2229-2238.
- McDevit D.C. & Saunders G.W. (2009). On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. *Phycological Research* 57: 131-141.
- McDevit D.C. & Saunders G.W. (2010). A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights. *Phycologia* 49: 235-248.
- Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Ronquist F. & Huelsenbeck J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Saunders G.W. (2005). Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos. Trans. R. Soc. B*, doi:10.1098/rstb.2005.1719.
- Széchy, M.T.M. & De Paula, J.C. (2010). Phaeophyceae (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>).
- Tronholm, A., Steen, F., Tyberghein, L., Leliaert, F., Verbruggen, H., Siguan, M. A. R. & De Clerck, O. (2010). Species delimitation, taxonomy, and biogeography of *Dictyota* in Europe (Dictyotales, Phaeophyceae). *J. Phycol.* 46: 1301-1321.
- Tronholm, A., Afonso-Carrillo, J., Sanso N.M., Leliaert F., Fernandez-Garcia C., and de Clerck O. (2013). Taxonomy of the *Dictyota ciliolata*-*crenulata* complex (Dictyotales, Phaeophyceae). *Phycologia* 52: 171-181. DOI: 10.2216/12-005.1
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher G., Nei, M., Kumar, S. (2001). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. DOI: 10.1093
- Wynne, M.J. (2011). A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: third revision. *Nova Hedwigia Beihefte* 140: [1-6], 7-166.