Cíntia Schultz Coimbra

Inferências filogenéticas na ordem Fucales
(Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum*
C.Agardh do Atlântico Sul

São Paulo
2006

Cíntia Schultz Coimbra

Inferências filogenéticas na ordem Fucales
(Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum*
C.Agardh do Atlântico Sul

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

Orientador(a): Prof^a. Dra. Mariana C. de Oliveira

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Edison José de Paula (*in memoriam*)

São Paulo
2006

Coimbra, Cíntia Schultz

Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Agardh do Atlântico Sul. 71 páginas.

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

1. *Sargassum* 2. Fucales 3. Filogenia molecular 4. ITS
5. *rbcL* 6. *rbcLS* 7. SSU *rDna*

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)
Orientador(a)

ÍNDICE

Capítulo 1.	Introdução Geral	03
Capítulo 2.	VARIABILIDADE FENOTÍPICA DOS TÁXONS DO SUBGÊNERO <i>Sargassum</i> E ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ESTUDOS FILOGENÉTICOS	18
Capítulo 3.	INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS PARA A ORDEM FUCALES BASEADAS EM SEQUÊNCIAS DO GENE SSU rDNA	33
Capítulo 4.	FILOGENIA DO GÊNERO <i>Sargassum</i> FUCALES, PHAEOPHYCEAE) BASEADA NA COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES ESPAÇADORAS ITS2 e rbcLS DE ESPÉCIES DO INDO-PACÍFICO E ATLÂNTICO	51
	Considerações Finais	70

Ao meu maior amor, meu filho Vinícius.

*"Aprendemos que na vida, o que jamais
nos leveram é a nossa fé, o conhecimento
e a certeza de viver um amor
de muitas vidas"
CSC*

RESUMO/ ABSTRACT

RESUMO

O gênero *Sargassum* C. Agardh (Sargassaceae) constitui um dos mais representativos dentre os 41 gêneros da ordem Fucales (Phaeophyceae, Heterokontophyta), é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do globo e é considerado um importante componente da flora marinha. Devido ampla variabilidade fenotípica é considerado um dos gêneros de taxonomia mais complexa dentre as algas pardas, como são popularmente conhecidos os representantes da classe Phaeophyceae. A filogenia da ordem Fucales é bastante discutida para gêneros do hemisfério norte, mas ainda pouco elucidada. Os estudos de filogenia referentes ao gênero *Sargassum* são escassos, limitando-se a poucos marcadores moleculares, com baixa resolução no âmbito inter-específico e limitados à espécies de ocorrência nos oceanos Indo-Pacífico e Atlântico Norte. Nenhum estudo filogenético inclui espécies do Atlântico Sul para este gênero. Este estudo é pioneiro na análise de seqüências de diferentes marcadores moleculares para espécies do Atlântico Sul. Neste estudo, foram seqüenciados completamente os marcadores moleculares nucleares SSU rDNA e ITS2 para os táxons infra-genéricos *Sargassum cymosum* var. *cymosum*, *S. cymosum* var. *nanum*, *S. furcatum*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare*. Todas as seqüências obtidas para ambos os marcadores apresentaram 100% de identidade entre os táxons analisados. Foram feitas seqüências também para o marcador molecular plastidial *rbcl* (parcial) e espaçador *rbclS* para as espécies *S. filipendula*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare* que resultaram também em 100% de identidade. Análises filogenéticas de cada um dos marcadores moleculares, incluindo nossas seqüências e aquelas disponíveis no Genbank e geradas pelos métodos de inferência “Neighbour-joining”, máxima parcimônia e máxima verossimilhança se apresentaram robustas e corroboram outros resultados descritos na bibliografia referente a ordem Fucales e ao gênero *Sargassum*. Entretanto, tais resultados fornecem um forte indício da necessidade de busca de marcadores moleculares eficientes, devidamente respaldados por estudos de hibridação *in vitro*, dados ecológicos e de biogeografia para um melhor entendimento acerca das espécies ocorrentes na costa brasileira.

Palavras Chave: *Sargassum*, Fucales, filogenia molecular, ITS, *rbcl*, *rbclS*, SSU rDNA.

ABSTRACT

The genus *Sargassum* C. Agardh (Sargassaceae) is one of the most conspicuous among the 41 genera of the order Fucales (Phaeophyceae, Heterokontophyta). The genus has a broad distribution in the tropical and subtropical regions of the world, and is considered an important component of the marine flora. Due to a high phenotypic variation, the taxonomy of the genus is considered of the most complex among the brown seaweeds, as are known the representatives of the class Phaeophyceae. The phylogeny of the order Fucales was studied for the North Hemisphere genera, but is still not well understood. The phylogenetic studies of the genus *Sargassum* are scarce and limited to a few molecular markers, presenting low resolution for inter-specific analysis and are available only for species from the Indo-Pacific and the North Atlantic. There are no phylogenetic studies including species from the South Atlantic for the genus. This study is the first to analyze sequences from different molecular markers for species from the South Atlantic. In this study, the nuclear SSU rDNA and ITS2 were completely sequenced for the infra-generic taxa *Sargassum cymosum* var. *cymosum*, *S. cymosum* var. *nanum*, *S. furcatum*, *S. stenophyllum* and *S. vulgare*. All the sequences for both markers presented 100% identity among analyzed taxa. Sequences were also obtained for the chloroplast marker *rbcLS*, including partial *rbcL* and the spacer region *rbcLS* for the species *S. filipendula*, *S. stenophyllum* and *S. vulgare*. These sequences also presented 100% identity among analyzed taxa. Phylogenetic analysis of each of the molecular markers, including our sequences together with other sequences available in the Genbank and generated by the inference methods Neighbour-joining, maximum parsimony and maximum likelihood were robust and similar to other results described in the literature for the order Fucales and the genus *Sargassum*. Nonetheless, these results are an indicative of the need for more efficient molecular markers, associated with data from *in vitro* hybridization, ecology and biogeography for a better understanding about the taxa occurring on the Brazilian coast.

Key words: *Sargassum*, Fucales, molecular phylogeny, ITS, *rbcL*, *rbcLS*, SSU rDNA.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Sargassum* C. Agardh, família Sargassaceae, apresenta inquestionável importância como componente da flora marinha de regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios do globo (Paula 1988, Széchy *et al.* 2006). Constitui um dos mais representativos dentre os 41 gêneros da ordem Fucales (Phaeophyceae, Heterokontophyta), possuindo um número de estimado de 485 espécies (Guiry *et al.* 2006).

As plantas de *Sargassum* são constituídas por apressório, eixos principais e ramos laterais, os quais se diferenciam a partir dos eixos principais e constituem a maior parte do talo (Figura 1.1). Os ramos de última ordem são laminares e assemelham-se às folhas das angiospermas, possuindo uma “nervura central”, sendo denominados filóides. Em algumas espécies, as plantas podem apresentar vesículas flutuadoras (aerocistos) e, cavidades com poros, contendo ou não tufo de pêlos. Tais estruturas são chamadas criptostomas (Figura 1.1).

Figura 1.1: (a) desenho esquemático de uma planta de *Sargassum* com três ramos laterais; (b) aspecto dos receptáculos masculinos; (c) aspecto dos receptáculos femininos; (d) vesículas

flutuadoras ou aerocistos; (e) aspecto do corte transversal do filóide na região do criptostoma. Baseado em Paula (1988).

O talo de *Sargassum* é diplóide e, freqüentemente, considerado como sendo o esporófito (Clayton 1988). Neste caso, quando fértil, apresenta meiosporângios que produzem meiosporos. Estes esporos, ao invés de serem liberados, desenvolvem-se brevemente, permanecendo presos ao esporófito, podendo ser considerados nesta fase efêmera como gametófitos (Figura 1.2). Nesse caso, o ciclo deve ser denominado pseudodiplonte (van den Hoek et al, 1995), de forma similar ao que ocorre em angiospermas. Porém, outros autores consideram que tais meiosporos podem ser apenas elementos reprodutivos, classificando o ciclo como haplobionte diplonte (Clayton 1988). Assim permanece ainda na literatura atual uma polêmica sobre o ciclo de vida das espécies de *Sargassum*. Quaisquer que sejam as interpretações, uma planta de *Sargassum* fértil apresenta estruturas diferenciadas para reprodução, denominadas receptáculos, as quais contêm os elementos reprodutivos formados no interior de cavidades chamadas de conceptáculos (Figura 1.2).

Figura 1.2: Modelo geral do ciclo de vida no gênero *Sargassum*. O esquema destaca a ocorrência dos eventos sobre o talo adulto. A meiose gamética ocorre no interior do conceptáculo sendo seguida de mitoses. No caso do conceptáculo feminino (a) (b), apenas um núcleo permanece, enquanto que os demais se degeneram (c). O núcleo gamético feminino é fecundado pelo gameta masculino. As etapas entre a meiose e a fecundação são consideradas como fase gametofítica reduzida na interpretação do ciclo como pseudodiplonte. O corte pontilhado destaca à direita os eventos que ocorrem sobre o talo, incluindo as fases iniciais do embrião (e) até a formação inicial de rizóides (f).

Fotografia do conceptáculo masculino e as figuras das etapas pós-fecundação foram cedidas pelo Prof. Edison J. de Paula.

Considerando-se o ciclo de vida, observa-se que os elementos reprodutivos masculinos dotados de flagelos, deslocam-se até os conceptáculos na superfície do receptáculo, onde encontram os oogônios. Após a fertilização do oogônio, o zigoto permanece aderido à mucilagem da superfície do receptáculo, por período variável de acordo com a espécie e as condições ambientais. Alguns autores, como Yoshida (1983), reportam que as primeiras etapas do desenvolvimento podem ocorrer com o zigoto aderido à superfície dos receptáculos. Estes autores observaram que, frequentemente, a liberação do produto da reprodução para o ambiente ocorre já com este em estágio multicelular, apresentando também o desenvolvimento das células iniciais dos rizóides. Em *Sargassum muticum*, foi demonstrado por Norton & Fetter (1981) e Deysher & Norton (1982) que a maioria dos propágulos é liberada em estágio já desenvolvido, reduzindo a fase planctônica do ciclo. Após a fixação no substrato, o desenvolvimento do talo diplóide ocorre, até que este inicie a formação de estruturas reprodutivas, para dar continuidade a um novo ciclo (Figura 1.2).

No que se refere à distribuição do sexo entre os indivíduos, as plantas de *Sargassum* podem ser designadas como dióicas (unissexuais) ou monóicas (bissexuais), de acordo com a ocorrência de apenas um dos sexos em cada planta, ou ambos os sexos no mesmo exemplar, respectivamente. Na planta monóica, ambos os sexos podem ocorrer, ou não, em um mesmo conceptáculo. Quando ambos os sexos ocorrem em um mesmo conceptáculo, ela pode ser referida como hermafrodita. Quando os receptáculos apresentam, na mesma planta, conceptáculos exclusivamente masculinos, ou femininos, as plantas usualmente recebem a designação de andromonóicas (*sensu* Paula & Eston 1987) ou andrógenas (*sensu* Kilar *et al.* 1992) (Figura 1.3).

As espécies do gênero *Sargassum* apresentam dominância por cobertura de áreas costeiras de substrato consolidado, tanto em áreas tropicais, quanto subtropicais, muitas vezes formando os chamados bancos de *Sargassum* (De Wreede 1976; Széchy & Paula 2000). Diversos trabalhos reportam a dominância, o papel na produção primária e o potencial invasor de algumas espécies deste gênero (Wanders 1976; Schiel & Choat 1980; Dreysher & Norton 1982, Ang 1986, Critchley 1983a, 1983b). Trabalhos realizados na costa brasileira destacam espécies do gênero *Sargassum* como mais abundantes no limite inferior da região entre-marés e no infralitoral de ecossistemas costeiros (Eston *et al.* 1986; Paula & Eston 1987; Paula 1989; Eston & Bussab 1990; Coimbra 1998; Coimbra & Berchez 2000; Széchy & Paula 2000; Széchy *et al.* 2006; Ghilardi *et al.* 2006). É importante ressaltar o potencial ecológico destas algas como abrigo, proteção e recurso alimentar para diversas espécies marinhas (Mountouchet 1979; Masunari 1987; Dubiaski-

Silva & Masunari 1995, 2000; Haddad & Chiaverini 2000; Széchy et al. 2001). As espécies deste gênero são frequentemente consideradas como hospedeiras, pois a sua ocorrência disponibiliza micro-habitats para diversas outras algas e componentes da fauna marinha. A forma e a estrutura do talo propiciam um nicho espécie-específico que é ocupado por outros organismos, tais como hidrozoários, anfípodos, copépodos, dentre outros (Masunari 1987; Barreto 1998).

Figura 1.3: Estratégias de reprodução e forma de ocorrência das estruturas reprodutivas nos receptáculos de *Sargassum*, adaptado de Kilar et al. (1992b) acrescido de informações das espécies de ocorrência na costa sudeste brasileira (Paula & Eston, 1987). Kilar et al. (1992b) baseou esta figura esquemática em espécies analisadas em coletas de um único mês, com exceção de *Sargassum polyceratum*, *S. cymosum*, *S. rigidulum*, *S. ramifolium* e de todas as espécies andrógenas (ou andromonóicas, *sensu* Paula & Eston, 1987). Populações de *S. rigidulum* estudadas foram de locais expostos. A numeração corresponde: 1. variedades anãs de locais expostos; 2. locais protegidos; 3. Paula (1978) *S. vulgare* var. *foliosissimum*; 4. Kilar et al. (1992) - androdíico e Paula & Eston (1987) citam apenas como plantas monóicas e dióicas. Os itens 5 e 6 correspondem às observações de coletas de Kilar et al. (1992b) citadas para as seguintes localidades: 5. "Indian River Lagoon" e, 6: "Homosassa River".

Um outro aspecto de grande relevância ecológica neste gênero refere-se à atuação de metabólitos secundários produzidos por estas algas, os quais reduzem a palatabilidade das algas para os herbívoros. Embora os estudos realizados com as espécies de ocorrência na costa brasileira reportem baixos teores de polifenóis, ocorrem exceções, como na espécie *Sargassum furcatum*, cujos elevados valores de polifenóis inibem a herbivoria pelo anfípoda *Parhyale hawaiiensis* (Pereira & Yoneshigue-Valentin 1999; Pereira 2002). Há registros de que espécies de *Sargassum* servem como refúgio em regiões temperadas, minimizando a ação da herbivoria de algas mais palatáveis que crescem sobre seu talo como epífitas (Pereira 2002).

O potencial econômico do gênero *Sargassum* deve-se ao seu uso como fonte de alginato, um ficocolóide encontrado na parede celular de algumas algas pardas. Este ficocolóide apresenta ampla utilização comercial, sendo aproveitado nas indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica, como espessante e emulsificante (Oliveira Filho & Paula 1979). No âmbito alimentar, pode-se citar uma diversidade de produtos em que o uso deste ficocolóide incrementa o valor comercial dos mesmos. Critchley (1993) considera que cerca de 50% do uso do alginato está relacionado à indústria têxtil, na qual corresponde ao agente emulsificante das tintas usadas como corante de tecidos. Na indústria farmacêutica, o alginato é utilizado na composição de cápsulas de medicamentos e próteses dentárias, dentre outros usos associados à medicina estética e à cosmética. A qualidade do ficocolóide extraído de espécies de *Sargassum* encontrados na costa brasileira é inferior e não se compara com a qualidade daquele que é extraído de espécies dos gêneros *Ascophyllum*, *Laminaria* e *Macrocystis* (Oliveira Filho & Paula 1979). Entretanto, estes autores apontam para a possibilidade de que o aproveitamento do alginato extraído das espécies de *Sargassum* do sudeste brasileiro seja capaz de suprir uma parte da demanda do mercado interno.

Ainda no que se refere ao potencial econômico deste gênero, pode-se reportar que as espécies do gênero *Sargassum* têm sido utilizadas como complemento alimentar em rações para animais domésticos (Chapman & Chapman 1980; Ang 1985; Trono & Lluisma 1990; Thomas & Subbaramaiah 1991; Széchy & Paula 2000) e como incremento adicionado à dieta de peixes em regiões costeiras (Ohno *et al.* 1990). Além disso, pode-se destacar o uso de espécies deste gênero na produção de fertilizantes, principalmente na Índia, Filipinas e Vietnã (Surialink 2006). Em especial no Vietnã, também se observa a aplicação de plantas secas de *Sargassum* para fins medicinais, na produção de chás, por serem fonte de iodo e fucoidanos. Os fucoidanos são polissacarídeos sulfatados característicos de todas as algas pardas (Masuda *et al.* 1993; Surialink 2006).

Apesar da importância ecológica e do potencial econômico, a taxonomia deste gênero é complexa e ainda não está bem estabelecida desde a sua descrição original. A classificação do gênero *Sargassum* foi validada em 1820 por Carl Agardh (1820). O nome do gênero foi utilizado antes por Rumphius (1750), que assim o denominou no sentido de assemelhar-se ao nome “sargaço”, que era usado pelos navegadores portugueses para descrever as plantas flutuantes no Atlântico Norte. Silva *et al.* (1996) consideraram que a maneira como foi conduzida a princípio a classificação das espécies deste gênero contribuiu para aumentar a dificuldade na determinação dos critérios taxonômicos, uma vez que muitas espécies foram descritas sem uma padronização de critérios, em um contexto de confusões e rivalidades entre especialistas.

Após algumas tentativas de estabelecer critérios para um sistema de classificação que esclarecesse as relações evolutivas entre as diversas espécies que vinham sendo coletadas, J. Agardh (1889) elaborou um sistema clássico, separando o gênero em cinco subgêneros. Utilizou a morfogênese de ramos primários e filóides como principal critério distintivo. Os subgêneros segregados por J. Agardh foram: *Phyllotrichia*, *Schizophycus*, *Bactrophycus*, *Arthrophycus* e *Eusargassum*. O último citado é denominado atualmente apenas como *Sargassum*, e corresponde ao subgênero em que estão incluídos todos os dezessete táxons infra-genéricos citados para a costa brasileira (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Listagem dos táxons infra-genéricos citados para a costa brasileira. Citação de *Sargassum acinarum* (Linneus) Setchell foi questionada por Nunes (1999).

TÁXONS INFRAGENÉRICOS	
1.	<i>Sargassum acinarum</i> (L.) Setchell (citação única por Taylor, 1960 no sul da BA)
2.	<i>Sargassum cymosum</i> var. <i>cymosum</i> C. Agardh
3.	<i>Sargassum cymosum</i> var. <i>nanum</i> E. J. Paula & E. C. Oliveira
4.	<i>Sargassum filipendula</i> var. <i>filipendula</i> C. Agardh
5.	<i>Sargassum filipendula</i> C. Agardh var. <i>montagnei</i> (Baley) Grunow
6.	<i>Sargassum filipendula</i> C. Agardh var. <i>pinnatum</i> Grunow
7.	<i>Sargassum filipendula</i> C. Agardh var. <i>laxum</i> J. Agardh
8.	<i>Sargassum furcatum</i> var. <i>furcatum</i> Kützing
9.	<i>Sargassum hystrix</i> J. Agardh
10.	<i>Sargassum platycarpum</i> Montagne
11.	<i>Sargassum polyceratium</i> Montagne
12.	<i>Sargassum ramifolium</i> Kützing
13.	<i>Sargassum rigidulum</i> Kützing
14.	<i>Sargassum stenophyllum</i> (Mertens) Martius
15.	<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>vulgare</i> C. Agardh
16.	<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>foliosissimum</i> (Lamouroux) J. Agardh
17.	<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i> E. J. Paula

A acentuada plasticidade fenotípica observada dentro de uma mesma população e a dificuldade na delimitação das espécies do gênero levaram a uma ampla gama de

estudos taxonômicos de grande relevância (Agardh 1889; Grunow 1915, 1916; Setchell 1931, 1933, 1935, 1936; Womersley 1954; Bertossi & Ganesan 1973; Yoshida 1983; Kilar & Hanisak 1989; Kilar 1992), que serão abordados no capítulo 2.

No âmbito nacional, o estudo do subgênero *Sargassum*, assim como o desenvolvimento da ficologia no Brasil, pode ser dividido em três fases. A primeira fase é representada por descrições de espécies procedentes de coletas das expedições botânicas registradas em obras históricas, como as de Martius *et al.* (1833), Montagne (1839), Möbbs (1889; 1890) e Martens (1870), detalhadas por Oliveira (1977). Devido à grande representatividade das espécies de *Sargassum* em áreas costeiras, na segunda fase é incluída a grande maioria dos estudos de levantamento de flora, destacando-se aqueles estudos que apresentam descrições e ilustrações de táxons infra-genéricos de *Sargassum* como em Joly (1951, 1957 e 1965), Taylor (1960), Yoneshigue-Braga (1970) e Ugadim (1973). A terceira fase foi marcada por um momento em que a ficologia no país buscava a resolução de questões taxonômicas de grupos específicos e representativos da flora. Destacam-se nesta fase os trabalhos de Paula (1978, 1984 e 1988), Oliveira & Paula (1979), Paula & Oliveira (1980, 1982) e Matida *et al.* (1988). Esses estudos mostram maior abrangência sobre o gênero, incluindo taxonomia, aspectos ecológicos, avaliação do potencial econômico e técnicas de cultivo associadas aos testes de hibridação em laboratório. Destaca-se o empenho e o legado deixado pelo professor e pesquisador Dr. Édison José de Paula, que apresentou o estudo mais crítico do gênero no Estado de São Paulo, citando oito novos táxons infra-genéricos (Paula 1988), um dos quais representa uma nova variedade, *S. cymosum* var. *nanum* (Paula & Oliveira 1982), dentre outros estudos relativos ao gênero (Paula 1978, 1984; Paula & Oliveira 1980, 1982; Széchy 1996; Széchy & Paula 1998; Fortes-Xavier 2000). Destacam-se também alguns estudos, que apesar de estarem relacionados às algas pardas em geral, incluíram o gênero *Sargassum* com detalhamento taxonômico (Guimarães 1981; Széchy 1986; Széchy & Cordeiro-Marino 1991; Bouzon & Sauer 1993; Ouriques 1997; Nunes 1999; Crispino 2000).

Nas décadas de 1980 e 1990, além de ser realizado um maior esforço em detalhar os aspectos de morfologia e reprodução deste grupo no Brasil, firma-se no panorama científico mundial o uso da comparação de seqüências homólogas de DNA, dentre outras técnicas moleculares, como ferramentas adicionais para auxiliar a sistemática. No princípio, as técnicas de seqüenciamento de DNA ofereciam custo elevado. Na medida em que diminuíram os custos de seqüenciamento, as análises moleculares passaram a ser aplicadas para todos os grupos de algas, o que vem “revolucionando” a taxonomia e filogenia destes organismos (Harper & Saunders 2002). Os estudos feitos em filogenia nas ordens de algas pardas, revisados por Druehl *et al.* (1997) e mais recentemente por

Rousseau *et al.* (2001), revelaram que resultados conclusivos ainda são escassos em vista da complexidade dos táxons incluídos. O que se pode afirmar ao certo é que os genes nucleares que codificam o rRNA das subunidades pequena e grande do ribossomo (Figura 1.4) correspondem a marcadores moleculares de amplo uso em filogenia de grandes grupos, como os das algas vermelhas. Estes genes são conhecidos em eucariotos como: 18S (“small subunit rRNA gene” SSU rDNA) e 28S (“large subunit rRNA gene” LSU rDNA). Entretanto, para as algas pardas, estes genes apresentam-se pouco ou nada variáveis, sendo úteis quando de forma combinada com um ou mais marcadores para estudos de filogenia. Rousseau *et al.* (2001) fazendo uso da combinação de seqüências de SSU rDNA parciais e LSU rDNA completas, apontaram para a necessidade do uso de outro marcador molecular e, assim como Serrão *et al.* (1999), destacaram o uso de seqüências das regiões dos espaçadores internos transcritos de genes ribossômicos (ITS1 e ITS2- Figura 1.4) como alternativa viável para esclarecer a filogenia da ordem. Saunders & Druehl (1992) concluíram que SSU rDNA não seria o melhor marcador para estudar as relações filogenéticas entre as famílias da ordem Laminariales; os mesmos autores em um outro trabalho, optaram por utilizar ITS1 (Druehl *et al.* 1997). O capítulo 3 desta tese apresenta análise molecular com abrangência na ordem Fucales, utilizando como marcadores moleculares as seqüências de SSU rDNA.

Figura 1.4: Desenho esquemático de um cloroplasto característico de Phaophyceae que apresenta duas membranas internas mais a dupla membrana de retículo endoplasmático (RE) e núcleo usualmente envolto pela membrana externa do RE. Destaque para os genes nuclear e plastidial que foram utilizados como marcadores moleculares nesta tese. ACIMA: genes nucleares que codificam para o rRNA das subunidades pequena (SSU ou 18S), grande (LSU ou 28S) e 5.8S, separados pelos espaçadores internos transcritos (as regiões ITS1e ITS2). Este conjunto ocorre repetidas vezes, em tandem e intercalado pelos espaçadores intergênicos (IGS); ABAIXO: gene plastidial que codifica para as subunidades grande (*rbcL*) e pequena (*rbcS*) da enzima ribulose 1, 5-bifosfato carboxilase (Rubisco), intercalado pelo espaçador *rbcLS*.

Os resultados apresentados pelos autores acima citados e os apresentados no capítulo 3 deste estudo reforçam a necessidade também de estudos testando diferentes marcadores moleculares, buscando eficiência em níveis inter-específicos até intra-populacionais. Entre esses marcadores estão sendo utilizados os ITSs dos genes ribossomais (Yoshida *et al.* 2000; Stiger *et al.* 2000), bem como, o gene *rbcL* e a região espaçadora entre as subunidades *rbcL* e *rbcS* da Rubisco (Phillips & Fredericq 2000; Phillips *et al.* 2005) (Figura 1.4). O capítulo 4 apresenta o uso dessas seqüências objetivando o estudo inter-específico do gênero *Sargassum*. Este estudo de filogenia é o primeiro a incluir espécies deste gênero para o Atlântico Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARDH, C. A. 1820. Species algarum rite cognitae, cum synonymis, differentiis specifis et descriptionibus succintis. Lund, Ex Officina Berlingiana v. 1. (*apud* PAULA, 1978).
- AGARDH, J. G. 1889 Species Sargassorum Australiae. Kgl. Svenska Vetenska Akad. *Handl.* 23 (3): 1- 133, pl. 1- 31.
- ANG Jr., P. O. 1985. Phenology of *Sargassum siliquosum* J. Ag. and *Sargassum paniculatum* J. Ag. (Sargassaceae, Phaeophyta) in the reef flat of Balibago. *Proc. 5th Coral Reef Congress*, 5: 51- 57.
- ANG Jr., P. O. 1986. Analysis of vegetation structure of *Sargassum* community in the Philippines. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 28: 9- 19.
- BARRETO, C. C. 1998. Heterogeneidade estrutural de três espécies de macroalgas marinhas bentônicas e estrutura das comunidades fitais associadas. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Depto. de Ecologia. 127p.
- BERTOSSI, S. A. & E. K. Ganesan 1973. El genero *Sargassum* C. Agardh (Feofita) em el oriente de Venezuela. *Lagena*, Cumana, 31: 3- 22.
- BOUZON Z. L. E. & K. R. S. SAUER 1993. Chlorophyta e Phaeophyta bentônicas da Ilha de Ratones Grande, Santa Catarina, Brasil. *Ínsula*, 22: 187- 207.
- CHAPMAN V. J. & D. J. CHAPMAN, 1980. Seaweeds and their uses. Chapman and Hall. London. 3rd. edition. 334 pp.
- CLAYTON, M. N. 1988. Evolution and life histories of brown algae. *Botanica Marina* 31: 379- 387.
- COIMBRA, C. S. & F. A. S. BERCHEZ 2000. Habitat heterogeneity on tropical rocky shores: a seaweed study in southern Brazil. *Journal of Phycology* (supl.) 36 (3): 14.

- COIMBRA, C. S. 1998. Caracterização ecológica das comunidades bentônicas da região entre-marés no costão da Praia do Itaguá, São Paulo. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Depto. de Botânica 136p.
- CRISPINO L. M. B. 2000. Feofíceas do litoral do Estado do Espírito Santo. Dissertação (Mestrado) .Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. 193p.
- CRITCHLEY, A. T. 1983(a). The establishment and increase of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt populations within the Solent area of southern Britain. I. An investigation of the increase in number of populations individuals. *Botanica Marina*, 26: 539- 545.
- CRITCHLEY, A. T. 1983(b). The establishment and increase of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt populations within the Solent area of southern Britain.II. An investigation of the increase in canopy cover of the alga at low water. *Botanica Marina*, 26: 547- 552.
- CRITCHLEY, A. T. 1993. Introduction- Seaweed resources. In: M. OHNO & A. T. CRITCHLEY [Eds]. *Seaweed cultivation and Marine Ranching*, JICA, pp. 1- 6.
- DE WREEDE, R. E. 1976. The phenology of three species of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyta) in Hawaii. *Phycologia*, 15: 175- 183.
- DEYSHER , L. & T. A. NORTON 1982. Dispersal and colonization of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 56: 179-195.
- DRUEHL L. D.; C. MAYES; I. H. TAN; G. W. SAUNDERS 1997. Molecular and morphological phylogeny of kelp and associated brown algae. In: BHATTACHARYA D. [Ed], *Origin of algae and their plastids*, Springer, Wien, New York, pp. 221- 235.
- DUBIASKI-SILVA, J. & MASUNARI, S. 1995. Ecologia dos fitais de Caiobá, Matinhos, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 12:373- 396.
- DUBIASKI-SILVA, J. & MASUNARI, S. 2000. Variação sazonal e vertical da biomassa de *Sargassum cymosum* C. Agardh, 1820 (Phaeophyta) e da densidade de sua fauna vágil na Ponta das Garoupas, Bombinhas, Santa Catarina. *Anais do V Simpósio Brasileiro de Ecossistemas: conservação* Vitória- ES, Brasil. vol 2: 110-117.
- ESTON, V. & W. O. BUSSAB 1990. An experimental analysis of ecological dominance in a rocky subtidal macroalgal community. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 136: 179- 195.
- FORTES- XAVIER, A. C. M. 2000. O gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales) no litoral brasileiro. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Depto. de Botânica. 135p.
- GHILARDI, N. P.; M. T. FUJII; S. ROSSO; V. F. HADEL; F. A. S. BERCHEZ. 2006. Utilização do método dos povoamentos na caracterização de comunidades bentônicas em trecho do infralitoral consolidado da Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba (SP). In: *XI Congresso Brasileiro de Ficologia*, Itajaí (SC). Resumos. p.90.

- GRUNOW, A. 1915. Additamenta ad cognitionem Sargassorum. *Verh. Zool-bot. Ges.*, 65: 329- 448.
- GRUNOW, A. 1916. Additamenta ad cognitionem Sargassorum. *Verh. Zool-bot. Ges.*, 66: 1- 48, 136- 185.
- GUIMARÃES, S. M. P. B.; M. CORDEIRO- MARINO; N. YAMAGISHI- TOMITA 1981. Deep water Phaeophyceae and their epiphytes from northeastern and southeastern Brazil. São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, 4: 95- 113.
- GUIRY M. D.; N. E. DHONNCHA; F. RINDI 2006. AlgaeBase version 3.0. National University of Ireland, Galway. In: <http://www.algaebase.org> acessado em 20/10/2006.
- HADDAD, M. A. & CHIAVERINI, A. P. 2000. Repartição de espaço entre hidróides (Cnidaria, Hydrozoa) epifíticos em *Sargassum stenophyllum* (Phaeophyta, Fucales) de Guaratuba, Paraná. *Anais do V Simpósio Brasileiro de Ecossistemas: conservação*. 109: 101- 109.
- HARPER, J.T. & G.W. SAUNDERS 2002. Using molecular data to resolve the taxonomic limits of the red algal genera *Callophyllis*, *Euthora*, and *Pugetia* (Kallymeniaceae, Gigartinales). *Phycological Research*. 50: 275- 281.
- JOLY, A. B. 1951. Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e arredores. *Boletim do Instituto Paulista Oceanográfico*, 2 (1): 125- 138.
- JOLY, A. B. 1957. Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e arredores. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras*. Universidade de São Paulo, 14: 1- 196.
- JOLY, A. B. 1965. Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras*. Universidade de São Paulo, ser. bot., 21: 1- 393.
- KILAR, J. A. & M. D. HANISAK 1989. Phenotypic variability in *Sargassum polyceratum* (Fucales, Phaeophyta). *Phycologia*, 28: 491- 500.
- KILAR, J. A. 1992. Seasonal and between-plant variability in the morphology of *Sargassum mathielsonni* sp. nov. (Phaeophyta) from gulf of Mexico. *Journal of Phycology* 28: 114- 126.
- KILAR, J. A.; M. D. HANISAK; T. YOSHIDA 1992. On the expression of phenotypic variability: Why is *Sargassum* so taxonomically difficult? In: ABBOT, I. A. [Ed.] *Taxonomy of economyc seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean Species*, Vol. III. California Sea Grant College Probram, University of California, La Jolla, California, pp.95- 117.
- MARTENS, G. VON 1870. Conspectus algarum Brasiliae hactenus detectarum. *Vidensk. Meddr. dansk. Naturh. Foren.* 3: 144- 148.

- MARTIUS, K. F. P. VON; F. G. ESCHWEILLER & C. G. N. VON ESENERK, 1833. Flora Brasiliensis seu inumeratio plantarum in Brasília. Stuttgart *Sumptibus J. G.*, v.1, pt. 1: 1- 50.
- MASUDA, M.; A. TETSURO; S. KAWAGUCHI; H. Q. NANG; N. H. DINH. 1993. The use of *Sargassum mcclurei* as medical tea in Vietnam. *Japanese Journal of Phycology* (Sôru) 41: 39-42.
- MASUNARI, S. 1987. Ecologia das comunidades fitais. In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul-Sudeste Brasileira: síntese dos conhecimentos. *Academia de Ciências do Estado de São Paulo*, 1: 195- 253.
- MATIDA, A. K., R. ZELNIKE, E. C. OLIVEIRA, 1988. Identificação e caracterização de manitol em *Sargassum cymosum* Agardh, uma alga parda do litoral brasileiro. *Memórias de Instituto Butantã*, 50 (2): 47- 50.
- MÖBIOS, M. 1889. Bearbeitung der von H. Schenck in Brasilien gesammelten Algen. *Hedwigia*, 28: 309- 347.
- MÖBIOS, M. 1890. Algae Brasiliensis A. cl. Dr. Glaziou collectae. *Notarisia*, 5: 1065- 1090.
- MONTAGNE, J. F. C. 1839. Cryptogamas Brasiliensis seu plantae celulares quas in itinere per Brasiliam à céreb. Auguste de Saint- Hilaire collectas recensuit observationibusque nonnullis illustravit. *Annls. Sci. Nat. Bot.* 12; 42-44.
- MONTOUCHET, P. C. G. 1979. Sur la communauté des animaux vagiles associés à *Sargassum cymosum* C. Agardh, à Ubatuba, Etat São Paulo, Brésil. *St. Neotr. Fauna Env.*, 14: 33- 64.
- NORTON, T. A. & R. FETTER 1981. The seattlement of *Sargassum muticum* propagules in stationary and flowing water. *Journal Marine Biology Association of the United Kingdon* 61: 929- 940.
- NUNES, M. J. de C. 1999. Phaeophyta da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 271p.
- OHNO, M.; S. ARAI; M. WATANABE 1990. Seaweed succession on artificial reefs on different bottom substrata. *Journal Applied Phycology*. 2: 327- 332.
- OLIVEIRA FILHO, E. C. 1977. Algas marinhas bentônicas do Brasil. Tese (Livre-Docência), Universidade de São Paulo, São Paulo. 407p.
- OLIVEIRA FILHO, E. C. e E. J. PAULA, 1979. Potentiality for algin production in the São Paulo (Brazil) littoral region. In: *IX th International Seaweed Symposium*. JENSEN, A. e J. R. STEIN, (Eds.) Princeton. pp. 479- 486.
- OURIQUES, L. C. 1997. Feofíceas do Litoral do Estado de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 247p.

- PAULA, E. J. & E. C. OLIVEIRA 1980. Phenology of two populations of *Sargassum cymosum* (Phaeophyta, Fucales) of São Paulo state coast, Brazil. *Boletim de Botânica*. Universidade de São Paulo. 8: 21- 39.
- PAULA, E. J. & E. C. OLIVEIRA 1982. Wave exposure and ecotypical differentiation in *Sargassum cymosum* (Phaeophyta- Fucales). *Phycologia*, 21(2): 145- 153.
- PAULA, E. J. & V. R. ESTON 1987. Are there another *Sargassum* especies potentially as invasive as *S. muticum*? *Botanica Marina*, 30(5): 405- 410.
- PAULA, E. J. 1978. Taxonomia, aspectos biológicos e ecológicos do gênero *Sargassum* (Phaeophyta- Fucales) no litoral do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, 182p.
- PAULA, E. J. 1984. Estudos experimentais de cultivo e hibridação em *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) em condições de laboratório. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo. 246 p.
- PAULA, E. J. 1988. O gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim de Botânica*. Universidade de São Paulo 10: 65- 118.
- PAULA, E. J. 1989. Zonação nos costões rochosos: entre-marés. In: Anais do 1º Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul-Sudeste Brasileira: síntese dos conhecimentos. *Academia de Ciências do Estado de São Paulo*, 1: 266- 288.
- PEREIRA, R. C. & Y. YONESHIGUE-VALENTIN 1999. The role of polyphenols from tropical brown alga *Sargassum furcatum* on the feeding by amphipod herbivores. *Botanica Marina*, 42: 441- 448.
- PEREIRA, R. C. 2002. Ecologia Química Marinha. In: *Biologia Marinha*,. PEREIRA, R. C. e SOARES-GOMES A. [Eds], cap. 13, 283 – 310.
- PHILLIPS, N. & S. FREDERICQ, 2000. Biogeographic and phylogenetic investigations of the pan-pacific genus *Sargassum* with respect to Gulf of Mexico species. *Gulf. Mex. Sci.*, 18: 77- 87.
- PHILLIPS, N.; C. M. SMITH & C. W. MORDEN 2005. Testing systematic concepts of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) using portions of *rbcL-S* operon. *Phycological Research*, 53: 1- 10.
- ROUSSEAU, F.; R. BURROWES.; A. F. PETERS, R. KUHLENKAMP; B. de REVIERS 2001. A comprehensive phylogeny of the Phaeophyceae based on nrDNA sequences resolves the earliest divergences. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/ Life Sciences*, 342: 305- 319.
- RUMPHIUS, G. E. 1750. Herbarium amboinense par sexta. Vol 6. Amstelaedami, Amsterdam. 256 pp., XC. pls. (apud SILVA et al. 1996)

- SAUNDERS G. W. & L. D. DRUEHL 1992. Nucleotide sequences of the small-subunit ribosomal RNA genes from selected Laminariales (Phaeophyta): implications for kelp evolution. *Journal of Phycology*, 28:544- 549.
- SCHIEL, D. R. & J. H. CHOAT 1980. Effects of density on monospecific stands of marine algae. *Nature*, London. 285: 324- 326.
- SERRÃO E. A.; L. A. ALICE; S. H. BRAWLEY 1999. Evolution of Fucaceae (Phaeophyceae) inferred from nrDNA-ITS. *Journal of Phycology*, 35: 382- 394.
- SETCHELL, W.A. 1935. Hong Kong Seaweeds. IV. Sargassaceae. *Hong Kong Nat. (Supl. 4)*: 1- 24.
- SETCHELL, W.A. 1936. Hong Kong Seaweeds. V. Sargassaceae. *Hong Kong Nat. (Supl. 5)* : 1- 20.
- SETCHELL, W.A. 1931. Hong Kong Seaweeds. II. Hongkong Nat. 2: 237-57.
- SETCHELL, W.A. 1933. Hong Kong Seaweeds. III. Sargassaceae. *Hong Kong Nat. (Supl. 2)*: 33- 49.
- SILVA, P.C., BASSON, P.W. & MOE, R.L. 1996. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. *University of California Publications in Botany* 79: 1- 1259.
- STIGER V.; T.; HORIGUCHI; T. YOSHIDA; A. W. COLEMAN; M. MASUDA 2000. Phylogenetic relationship of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section *Phyllocystae* based on ITS 2 nrDNA sequences. *Phycological Research*, 48: 251- 260.
- SURIALINK, 2006. *Surialink Seaplants*. In: <http://www.surialink.com> acessado em 12/09/2006.
- SZÉCHY, M. T. de M. & E. J. PAULA 1998. Tipos Morfológicos em populações de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. *Leandra*, 12: 1- 10.
- SZÉCHY, M. T. de M. & E. J. PAULA 2000. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 23 (2): 121- 132.
- SZÉCHY, M. T. de M. 1996. Estrutura de Bancos de *Sargassum* (Phaeophyta- Fucales) do litoral dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Depto. de Botânica. 366p
- SZÉCHY, M. T. de M.; M. GALLIEZ; M. MARCONI 2006. Quantitative variables applied to phenological studies of *Sargassum vulgare* C. Agardh (Phaeophyta-Fucales) from Ilha Grande Bay, State of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Botânica*, 29 (1): 27- 37.

- SZÉCHY, M. T. de M.; V. G. VELOSO; E. J. PAULA 2001. Brachyura (Decapoda, Crustácea) of phytobenthic communities of the sublittoral region of rocky shores of Rio de Janeiro. *Tropical Ecology* 42: 231- 242.
- SZÉCHY, M. T. M. de e M. Cordeiro-Marino 1991. Feofícias do Litoral Norte do Estado do Rio de Janeiro. Brasil. *Hoehnea*, 18 (1): 205- 241.
- TAYLOR, W. R. 1960. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coast of the Americas. *Ann. Arbor. Michigan*. 870p.
- THOMAS, P. C. & K. SUBBARAMAIAH 1991. Seasonal variations in growth, reproduction, alginic acid, mannitol, iodine and ash contents of brown alga *Sargassum wightii*. *Indian Journal of Marine Sciences*, 20: 169- 175.
- TRONO JR., G. C. & A. O. LLUISMA 1990. Seasonality of standing crop of a *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta) bed in Bolinao, Pangasinan, Philippines. *Hydrobiologia*, 204/205: 331- 338.
- UGADIM, Y. 1973. Algas marinhas bentônicas do litoral sul do Estado de São Paulo e do litoral do Estado do Paraná II: Divisão Phaeophyta. *Acta Biológica*, 12 (1-4): 65-74.
- VAN DEN HOEK, C.; D. MANN; H. M. JAHNS 1995. Algae. An introduction to the phycology. Cambridge University Press, Cambridge. 627p.
- WANDERS J. B. W. 1976. The role of benthic algae in the shallow reef of Curaçao (Netherlands Antilles). II. Primary productivity beds on the Northeast coastal submarine plateau. *Aquatic Botany*, 2: 327- 335.
- WOMERSLEY, H. B. S. 1954. Australian species of *Sargassum* subgenus *Phyllotrichia*. *Australian Journal of Botany*, 2: 337- 54.
- YONESHIGUE-BRAGA, Y. 1970. Flora marinha bentônica da Baía de Guanabara e cercanias: II- Phaeophyta. *Publicações do Instituto de Pesquisas da Marinha*, 45; 1- 31.
- YOSHIDA, T. 1983 Japanese species of *Sargassum* subgenus *Bactrophycus* (Phaeophyta, Fucales). *J. Fac. Sci. Hokaido Univ. Series V (Bot.)* 13: 9- 246.
- YOSHIDA, T.; V. STIGER; T. HORIGUCH 2000. *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from and Hokkaido, *Japanese Phycological Research*, 48: 125- 131.

Capítulo 2

VARIABILIDADE FENOTÍPICA DOS TÁXONS DO SUBGÊNERO *Sargassum* E ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ESTUDOS FILOGENÉTICOS

I. INTRODUÇÃO

O gênero *Sargassum* apresenta-se como um dos mais complexos gêneros no que se refere à taxonomia, uma vez que os critérios que usualmente diferenciam os táxons são em grande parte morfométricos e ocorrem em gradações variáveis entre as espécies.

Observa-se neste gênero uma ampla variabilidade fenotípica que pode ser atribuída a condições ambientais, no que poderia se considerar morfotipos, ou genéticas (ecotipos), como documentado por Paula & Oliveira (1982) no Brasil. Além disto, está bem documentada a ocorrência de hibridização entre muitas espécies de *Sargassum* (Kilar & Hanisak 1988; Paula, 1984, Kilar *et al.* 1992a). Alguns estudos relacionados a outros gêneros de algas pardas, assinalam que neste grupo não há necessariamente um isolamento reprodutivo (Dieck & Oliveira, 1993; Catriona *et al.* 2005). A variabilidade morfológica em *Sargassum* se manifesta mesmo nas fases de desenvolvimento de uma mesma planta (Ang Jr. 1985; Kilar & Hanisak, 1988; Núñez-López & Casas-Valdéz, 1996; Gillespie & Critchley, 2001). Uma hipótese é aceitar a variabilidade morfológica encontrada como uma simples manifestação fenotípica o que implicaria em uma redução das espécies atualmente válidas, pois algumas espécies passariam a ser sinônimas de outras (Gillespie & Critchley, 2001). Existe uma outra linha de abordagem em que, na tentativa de elucidar a distinção entre espécies no gênero *Sargassum*, faz-se uso de um maior número de caracteres, incluindo o próprio grau de variabilidade fenotípica atribuído a uma determinada espécie, periodicidade reprodutiva e padrões ontogenéticos (Kilar *et al.*, 1992a). Kilar *et al.* (1992a) resumem esta questão da ampla variabilidade citando que esta pode ser temporal, intra-individual, inter-individual e relacionada a fatores ambientais. Segundo Catriona *et al.* (2005) alguns traços fenotípicos são variáveis enquanto outros são estáveis, assim, estudos puramente morfológicos podem ser bastante limitados. Ainda que estudos genéticos sejam mais trabalhosos, devem ser realizados, pois a bibliografia

corrente nos leva à conclusão de que o grupo das Phaeophyta apresenta-se ainda pouco diferenciado se comparado com as demais algas (Bhattacharya & Druehl, 1989; Neefus et al. 1993).

A ocorrência de variabilidade morfológica influenciada por condições ambientais é bem conhecida nas algas pardas (Rice & Chapman 1985; Bhattacharya & Druehl, 1989; Cheshire & Hallam, 1989; Cheshire & Conran, 1995, Miller et al., 2000; Serisawa et al., 2003, Catriona et al., 2005), podendo ser causadas por mudanças climáticas sazonais, principalmente em regiões temperadas, exposição ao embate de ondas (Russel 1978), profundidade e/ou tempo de emersão (de Ruyter van Steveninck & Breeman, 1987), dentre outros fatores.

Kilar et al. (1992a) destacam a variabilidade temporal observada em indivíduos de uma mesma espécie de *Sargassum*, mesmo considerando-se um único indivíduo. Estudos mais detalhados do gênero sobre o ciclo de vida de algumas espécies permitiram determinar se a espécie era perene, pseudoperene ou anual (Paula, 1978, 1984, 1988; Paula & Oliveira 1982; Kilar 1992; Kilar et al. 1992b; Ang, 1985; Ang & Trono, 1987). Entende-se por pseudoperene (sensu Ang & Trono, 1987), aquela planta em que os ramos laterais senescem antes do final do período reprodutivo e novos ramos laterais se originam na estação do ano seguinte, tanto diretamente do apressório, como do ramo primário. Para minimizar a variabilidade encontrada em uma mesma espécie, é importante utilizar como critério a descrição de plantas maduras e férteis.

Estudos mais recentes reportam a forte influência da temperatura sobre a variabilidade fenotípica em alguns gêneros de algas pardas, sendo *Fucus* o gênero mais estudado (Bhattacharya & Druehl, 1989). Em populações de espécies de *Sargassum* de ampla distribuição ao longo da costa brasileira, observam-se claramente tais diferenças quando as populações do nordeste e do sudeste são comparadas, de acordo com a classificação de zonas ficogeográficas sugerida por Oliveira Filho (1977). No entanto, Paula (1988) afirma que, com relação às variedades citadas para a costa brasileira, excetuando-se as variedades anãs, pequena ou nenhuma evidência de diferenciação populacional foi observada. Neste estudo, optou-se por considerar apenas a variedade anã de *Sargassum cymosum* além daquela que caracteriza a espécie, *S. cymosum* var. *cymosum*. Em vista disso, foram seqüenciadas a região ITS2 de ambas variedades (capítulo 4).

Neste capítulo serão apresentados os aspectos taxonômicos para o gênero *Sargassum* e a metodologia geral utilizadas nesta Tese.

II. TÁXONS INFRAGENÉRICOS DE *Sargassum* - VARIEDADES CITADAS PARA A COSTA BRASILEIRA

Ficologistas têm discutido nos últimos anos o significado de espécie biológica, mas frequentemente ponderam se este corresponde, ou não, a um conceito de natureza artificial, reconhecendo assim a dificuldade em descrever de forma única e significativa as variedades (Kilar *et al.* 1992b).

Nesta tese as variedades de *Sargassum* citadas para a costa brasileira não foram consideradas na identificação do material, excetuando-se as variedades anãs, as quais foram estudadas em uma série de experimentos de campo e laboratório (Paula 1988, Paula & Oliveira 1980, 1982; Paula & Sousa 1987).

Paula (1988) fez um estudo detalhado das espécies de *Sargassum* do litoral de São Paulo, onde sugere que o significado das variedades previamente identificadas (Taylor 1960) parece questionável apesar de aceito por autores contemporâneos. Ademais, considerando-se a alta frequência de ocorrência de plantas de fenótipo intermediário, a utilização de variedades deve ser bastante cautelosa e embasada por prévias avaliações experimentais.

Experimentos conduzidos pelo E. J. Paula e iniciados na década de 1980, concentraram-se em testar o fenótipo anão, a partir de populações de três espécies ocorrentes na costa brasileira, *S. cymosum*, *S. rigidulum* e *S. vulgare*. As populações anãs ocorrem em áreas mais expostas ao embate de ondas (Paula & Oliveira 1980; 1982; Paula & Sousa 1987). Assim, foram estabelecidos cultivos unialgais de tais espécies e dos híbridos obtidos dos cruzamentos entre as mesmas, comparando o crescimento e a maturação sexual entre plantas provenientes de locais protegidos e expostos. As populações de plantas anãs, e subseqüentes gerações produzidas *in vitro*, de *S. cymosum* e *S. vulgare*, originalmente obtidas em locais expostos, mantiveram-se monóicas e com as mesmas diferenças de tamanho e precocidade na maturação sexual em relação àquelas populações de plantas oriundas de locais protegidos; os cruzamentos entre as variedades produziram híbridos intermediários nas duas gerações obtidas nas condições de cultivo laboratorial (E. J. Paula, comunicação pessoal). As populações de *S. rigidulum* coletadas tanto em locais expostos como em locais protegidos, quando cultivadas *in vitro* produziram espécimes com talo de tamanho reduzido (E. J. Paula, comunicação pessoal).

Paula (1988) descreve e ilustra cinco tipos morfológicos de acordo com o grau de exposição ao embate de ondas, considerando a ocorrência de populações de morfologia intermediária. Além disso, o autor apresenta outras diferenças bastante evidentes entre as espécies de *S. cymosum* e *S. vulgare* quando comparadas com as suas respectivas variedades anãs, destacando o predomínio de plantas dióicas em locais protegidos e de plantas monóicas em locais expostos. As plantas anãs de ambas as espécies citadas

apresentam um talo em roseta com numerosos ramos principais e laterais primários e com apressório maior do que as plantas de locais protegidos, além da ausência de vesículas flutuadoras.

Alguns autores, como Russel (1978) referindo-se à *Fucus vesiculosus*, defendem a idéia de que a variabilidade fenotípica é resultado da seleção natural, onde fatores ambientais, como por exemplo a ação das ondas, operam sobre os genótipos em um habitat. Paula & Oliveira (1982) testaram a expressão do genótipo transplantando populações de *Sargassum cymosum* para ambientes de diferentes graus de exposição às ondas, e obtiveram resultados parcialmente de acordo com os observados por Russel (1978). Neste trabalho, as diferenças entre plantas consideradas anãs de ambientes expostos e aquelas dos ambientes protegidos são devidas às alterações genotípicas, uma vez que mantiveram a expressão de seus caracteres morfológicos quanto transplantadas, o que levou os autores a considerá-las como ecotipos (Paula, 1988).

A diferenciação fenotípica observada entre populações de *Sargassum* pode ocorrer de forma contrastante em áreas adjacentes com variação abrupta no grau de exposição às ondas, podendo ser resultante de um balanço entre seleção e fluxo gênico, tal como foi observado por Serrão *et al.* (1999) para espécies do gênero *Fucus*. O embate mecânico das ondas, a que estão sujeitos os talos de populações de áreas expostas, pode ser considerado como um fator desfavorável. Por outro lado, em condições protegidas, a elevada turbidez da água, comum em baías e enseadas, pode ser também considerado como um fator adverso à eficiência fotossintética. Na competição por maior adaptação, as plantas de áreas expostas, com talo mais reduzido e com viabilidade reprodutiva precoce, são favorecidas pela diminuição da área de atrito no embate mecânico e asseguram a ocorrência da reprodução. De forma oposta, quando o fator limitante é a turbidez da água, um talo mais longo propicia o aumento da área disponível para trocas gasosas e a presença deste em faixas mais próximas à superfície favorece a competição pela irradiância, de modo a assegurar a eficiência dos processos de ganho energético (Paula & Oliveira 1980, 1982; Paula & Sousa 1987).

III. CRITÉRIOS TAXONÔMICOS CONSIDERADOS PARA O SUBGÊNERO

Sargassum

A base de diferenciação taxonômica adotada na maioria dos estudos é a morfologia do filóide, principal caráter escolhido por Taylor (1960), Paula (1988) e muitos outros autores para identificação das espécies do gênero *Sargassum*. Outros caracteres, tais como morfologia das vesículas flutuadoras, das ramificações, e dos receptáculos foram considerados como suplementares. Kilar & Hanisak (1989) registraram a ocorrência do

que denominaram de “continuum morfológico” em relação aos fenótipos observados, os quais poderiam levar a um equívoco se analisados em amostras não populacionais.

Em estudos moleculares que objetivam uma abordagem inter-específica, como nesta tese, devem ser consideradas apenas populações estritamente características de cada espécie. Contudo, tendo em vista que todos os caracteres apresentam uma considerável plasticidade fenotípica, foram utilizados pelo menos oito indivíduos de cada população no processo de identificação. Dentre as situações que dificultam a identificação de uma espécie está a maturação do indivíduo. Plantas muito jovens apresentam forte variação dos caracteres taxonômicos, principalmente se aqueles considerados muito distintivos são de natureza merística (comprimento, largura) ou organizados em intervalos de classe (exemplo: abundância relativa). Quando os caracteres reprodutivos são tidos como decisivos para a identificação taxonômica das espécies pode ocorrer uma dificuldade adicional. Por conta destas questões, o presente trabalho consultou e seguiu os critérios das chaves de identificação de Taylor (1960), Paula (1988), Nunes (1999) e Fortes-Xavier (2000). Embora algumas das espécies de ocorrência na costa brasileira não tenham sido seqüenciadas para os marcadores empregados nos capítulos subseqüentes, todo o material proveniente das coletas foi identificado e as exsiccatas foram depositadas no Herbário Ficológico (SPF) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A compilação dos caracteres taxonômicos mencionados pelos estudos acima citados para as espécies de *Sargassum* (incluindo duas variedades anãs) de ocorrência na costa brasileira, foi priorizada de acordo com os critérios estabelecidos por Paula (1988). As diferenças em relação ao trabalho de Paula (1988) são as exclusões dos caracteres reprodutivos e inclusão de espécies de outras localidades (Figura 2.1), para ampliar para toda costa brasileira o uso de tais critérios sem depender da ocorrência da planta em estado fértil.

Além disto, pode-se destacar que observou-se uma dificuldade em obter coletas de populações características de cada espécie. Desta forma, nos pareceu justificada uma discussão acerca da variabilidade fenotípica com subseqüente compilação de dados taxonômicos da literatura nacional, antes de dar seguimento à metodologia aplicada em estudos de filogenia molecular, foco central deste estudo.

Figura 2.1: Distribuição de todos os táxons infragenéricos de *Sargassum* citados para a costa brasileira (Fortes-Xavier 2000).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção dos exemplares das populações

Para de garantir uma identificação correta de cada espécie, foram coletadas apenas plantas de populações conspícuas, apresentando morfologia típica da espécie em questão. Um mínimo de oito exemplares foi analisado para confirmar a presença dos caracteres distintivos de cada espécie. Neste estudo foram incluídas as espécies *Sargassum cymosum* com as variedades *S. cymosum* var. *cymosum* e *S. cymosum nanum*, *S. filipendula*, *S. furcatum*, *S. stenophyllum*, e *S. vulgare* (Tabela 2.2).

As plantas coletadas foram trazidas para o laboratório onde foram submetidas à limpeza e triagem com auxílio de microscópio estereomicroscópico para remover epífitas. Posteriormente, as porções mais jovens e preferencialmente os ramos férteis foram destacados e acondicionados para preservação em sílica gel para uso em extração de DNA total. Cada fragmento colocado em sílica gel recebeu numeração idêntica ao restante da planta, que foi posteriormente fixada em formol a 4% e herborizada como material testemunho. As exsicatas foram depositadas no Herbário Ficológico (SPF) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Tabela 2.2).

As espécies, incluindo as variedades mencionadas, foram seqüenciadas para diferentes marcadores moleculares. Parte do *rbcl* e a região espaçadora dos genes que codificam para a Rubisco (marcadores plastidiais) foram seqüenciados para as espécies *S. filipendula*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare*. Os marcadores nucleares SSU rDNA e ITS2 foram seqüenciados para os táxons infra-genéricos citados na Tabela 2.2, exceto para *S. filipendula*.

Tabela 2.2: Dados de coleta e herborização das espécies de *Sargassum* e marcadores moleculares analisados.

Espécies	Marcador molecular	local de coleta	Coletores	data	espécie testemunho SPF nº
<i>Sargassum cymosum</i> var. <i>cymosum</i>	SSU rRNA/ITS2	Pr. da Baleia, São Sebastião/SP	N.Yokoya & S.M.P.Guimarães	08/2002	56150
<i>Sargassum cymosum</i> var. <i>nanum</i>	SSU rRNA/ITS2	Pr. da Fortaleza, Ubatuba/SP	C.S.Coimbra & M.da C.Accioly	07/2003	(a ser incluído)
<i>Sargassum filipendula</i>	<i>rbcl</i> -S	Pr. da Fortaleza, Ubatuba/SP	C.S.Coimbra & M.da C.Accioly	07/2003	(a ser incluído)
<i>Sargassum furcatum</i>	SSU rRNA/ITS2	Pr. da Baleia, São Sebastião/SP	N.Yokoya & S.M.P. Guimarães	08/2002	56154
<i>Sargassum stenophyllum</i>	SSU rRNA/ITS2/ <i>rbcl</i> -S	Pr.Cibratel, Itanhaém/SP	C.S.Coimbra	09/2002	56155
<i>Sargassum vulgare</i>	SSU rRNA/ITS2/ <i>rbcl</i> -S	Pr. do Sul, Olivença/BA	C.S.Coimbra	08/2002	56151

2. Extração de DNA

A metodologia de extração foi realizada de acordo com Bellorín *et al.* (2002) com modificações nas etapas finais de lavagens.

Para a extração de DNA foram utilizadas aproximadamente 0,05 gramas de peso seco do material mantido em sílica gel, que foram macerados em nitrogênio líquido para o rompimento células. Em seguida o material macerado foi rapidamente adicionado a 2 ml de tampão de lise (1,5% CTAB; 1M NaCl; 0,5 mL EDTA; 0,1 M tris pH 8,0; 0,2 % β -mercaptoetanol) e incubado por cerca de 30-60 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado, e dividido em dois tubos de Eppendorf com aproximadamente 440 μ L em cada, aos quais foi adicionado 350 μ L de fenol e 350 μ L clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v:v). As amostras foram então centrifugadas (ca. 14000 x g durante 3 minutos, 4°C).

Após a centrifugação, formaram-se duas fases, a fase superior ou aquosa foi cuidadosamente transferida, com o uso de micropipetas com ponteiros cortadas na ponta, para um novo tubo Eppendorff e a fase inferior apolar foi descartada. Acrescentou-se 500 μ L

clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v:v) e novamente o material foi centrifugado (ca. 14000 x g durante 20 minutos, 4°C).

Acrescentou-se 0,6 volumes de álcool isopropílico (mantido no freezer à 4°C) e as amostras foram centrifugadas (ca. 14000 x g durante 15 minutos, 4°C). Em seguida o álcool foi descartado e acrescentou-se 1 volume de etanol à 70% (mantido no freezer à 4°C) e procedeu-se com a centrifugação (ca. 14000 x g durante 5 minutos, 4°C). Esta última etapa de lavagens em álcool 70% foi repetida. Ao final da última lavagem, os tubos de Eppendorf, com as amostras, foram colocados em “Speed Vacuum” até secagem completa (cerca de 30-40 minutos). Finalmente, observou-se o DNA preso a parede do Eppendorf e acrescentou-se 100 µL de água MilliQ (Millipore Products Division, Bedford, Massachusetts, USA) previamente autoclavada.

Após a extração o DNA total foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TBE 1X juntamente com um marcador de peso molecular padrão. Em cada eletroforese realizada, foi preparado um 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

As reações de amplificação foram feitas na termocicladora Minicycler (MJ Research, Watertown, EUA) e os ciclos variaram de acordo com o marcador molecular conforme mostrado na Tabela 2.3. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 50 µL, utilizando-se: 1X tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada “primer” (“forward” e “reverse”), aproximadamente 2 ng de DNA e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, EUA).

Tabela 2.3: Ciclo de amplificação de DNA (PCR) para cada região marcadora: a) SSU rDNA; b) ITS2 e c) *rbcL-S*.

a) SSU rDNA (na etapa 4 voltar para 2: 34X)						
Etapas	1	2	3	4	5	6
°C	94	94	60	72	72	4
Tempo	4'	30''	1'	2'	7'	∞
b) ITS 2 (na etapa 4 voltar para 2: 29X)						
Etapas	1	2	3	4	5	6
°C	94	94	56	72	72	4
Tempo	4'	30''	30''	45''	7'	∞
c) <i>rbcL-S</i> (na etapa 4 voltar para 2: 34X)						
Etapas	1	2	3	4	5	6
°C	94	94	45	72	72	4
Tempo	4'	1'	1'	1': 30''	7'	∞

Os pares de “primers” utilizados nas amplificações por PCR para SSU rDNA foram MAR 5’ e MAR 3’. Nas reações de PCR de seqüências de ITS2 utilizou-se os “primers” SARG-ITS2F e SARG-ITS2R e para aquelas seqüências do rbcL e espaçador da Rubisco os “primers” utilizados foram F993 e RbcS-Sarg 3’ (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: “Primers” utilizados para cada marcador, apresentando suas seqüências, posições nas seqüências de *Sargassum* AS para todos marcadores As demais colunas representam as etapas da metodologia em que foram usados e as fontes de referência. R=A/G, S=C/G e W=A/T.

a) SSU rDNA				
“primer”	seqüência	posição	uso	fonte
MAR 5	5´-AACCTGGTTGATCCTGCCAGTRGTSATATG- 3´	inicial	PCR/ SEQ	Sogin 1990
530F	5´ -GAGGGCAAGTCTGGTG- 3´	499	SEQ	Milstein & Oliveira 2005
536R	5´ - GAATTACCGCGGCTGCTG- 3´	511	SEQ	Bird <i>et al.</i> 1992
1055F	5´ -GGTGGTGCATGGCCG- 3´	1239	SEQ	Bird <i>et al.</i> 1992
1055R	5´- CGGCCATGCACCACC- 3´	1239	SEQ	Bird <i>et al.</i> 1992
18S 3´	5´ - GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA- 3	final	PCR/SEQ	Sogin 1990
b) ITS				
“primer”	seqüência	posição	uso	fonte
SARG-ITS2F	5´-CGATGAAGAACGCAGCGAAATG- 3´	1	PCR/SEQ	Yoshida <i>et al.</i> (2000) modificado neste estudo
SARG-TS2F	5´-TCCTCCGCTTAGTATATGCTT- 3´	651	PCR/SEQ	Yoshida <i>et al.</i> (2000) modificado neste estudo
c) rbcL-S				
“primer”	seqüência	posição	uso	fonte
F993	5´-GGTACTGTTGTAGGTAAATTWGAAGG- 3´	1	PCR/SEQ	Freshwater <i>et al.</i> 1994
SARG-RrbcS-	5´- GTTCTTGTAAGTCTCA- 3´	637	PCR/SEQ	Freshwater <i>et al.</i> 1994 modificado neste estudo

Após as reações de amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese. Cada gel foi preparado em concentração de 0,7% de agarose e corado em brometo de etídeo (Sambrook *et al.* 1989) para a verificação do tamanho e quantidade de DNA amplificado através de comparação de intensidade de bandas formadas no gel de cada amostra em relação às bandas do marcador de peso molecular de quantidade padronizadas (1Kb Ladder, Invitrogen). Para cada amostra de DNA de uma determinada espécie, foram feitas pelo menos três reações de PCR distintas, para minimizar eventuais erros de incorporação de bases durante o ciclo de PCR (Baldwin *et al.* 1995). Controles negativos para as PCR, com todos os reagentes exceto o DNA, foram realizados

periodicamente. Os produtos de PCR foram purificados em colunas MicroSpin™ S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA) e diretamente seqüenciados.

4. Seqüenciamento

As reações de amplificação para seqüenciamento foram feitas na termocicladora MiniCycler (MJ Research), cada uma com aproximadamente 40 ng de produto de PCR purificado, 3,2 pmol de “primer” e o “kit” de seqüenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O “kit” de seqüenciamento é composto por: dNTP, dideoxynucleosídeo (ddNTP) com marcadores fluorescentes, tampão, cloreto de magnésio e a enzima Taq polimerase. Os “primers” que foram utilizados constam na Tabela 2.4 e o ciclo de sequenciamento na Tabela 2.5.

Os produtos da PCR contendo os ddNTP marcados foram precipitados em isopropanol à 75% e em seguida estes foram lavados em etanol à 70%, para a remoção de resíduos não incorporados. O etanol a 70% foi desprezado e as amostras ressuspendidas “Hi-Di Formamide- Genetic Analysis” Grade (Applied Biosystems). As amostras foram analisadas nos seqüenciadores automáticos ABI PRISM™ 310 ou ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabela 2.5: Ciclo de seqüenciamento.

Seqüenciamento (na etapa 4 voltar para 2: 40X)					
Etapas	1	2	3	4	Mantida protegida da luz
Temperatura °C	96	54	60	4	
Tempo	10"	20"	4'	∞	

5. Alinhamentos

As seqüências resultantes da etapa anterior, obtidas nas direções direta e reversa, foram alinhadas no programa BioEdit (HALL T.A. 1999) para gerar uma seqüência consenso para cada marcador de cada espécie estudada. Os cromatogramas, arquivos gráficos produzidos pelo seqüenciador durante o processo de seqüenciamento, foram importantes para uma avaliação de eventuais dúvidas quanto a nucleotídeos diferentes ocorrendo na mesma posição. A cada seqüência consenso gerada, efetuou-se a comparação com outras disponíveis no GenBank através do programa BLASTN (Altschul et al. 1990).

As seqüências consenso de cada marcador para cada táxon foram alinhadas e comparadas. Matrizes de alinhamento para cada marcador molecular foram geradas usando o programa ClustalW dentro do BioEdit incluindo as seqüências obtidas neste trabalho juntamente com outras seqüências obtidas no GenBank (listadas nos capítulos 3

e 4). Seqüências correspondentes aos “primers” de amplificação e inserções/deleções (indels) e regiões variáveis que poderiam ser alinhadas com ambigüidade, foram removidas dos alinhamentos. A partir de uma matriz de seqüências homólogas de nucleotídeos é possível gerar árvores através de diferentes métodos de reconstrução filogenética.

6. Inferências filogenéticas

As matrizes de alinhamento de seqüências homólogas de nucleotídeos foram utilizadas para estabelecer as árvores através de três métodos de inferência: a) Distância (Neighbour-Joining, NJ); b) Máxima Parcimônia (MP) e; c) Máxima Verossimilhança (ML). As análises de cada capítulo apresentaram conjunto de dados distintos e, portanto, seguem descritas separadamente. Todas as análises filogenéticas foram feitas no programa PAUP 4.0b8 (Swofford 2000). O modelo evolutivo apropriado foi selecionado no Modeltest (Posada & Crandall 1998).

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). 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. 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. Análises de “bootstrap” (Felsenstein 1985) foram feitas para os métodos descritos acima. Para todas as análises, os valores de “bootstrap” foram considerados baixos até 70%, moderados de 71% a 90% e altos acima de 90%.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; W. GISH; W. MILLER; E. W. MYERS; D. J. LIPMAN 1990. Basic local alingent search tool. J. Molecular Biology 215: 403-410.
- ANG, P. O. & G. C. TRONO 1987. The genus *Sargassum* (Phaeophyta, Sargassaceae) from Balibago, Calatagan, Philippines. Bot. Mar. 30: 387-397.
- ANG, P. O. 1985. Phenology of *Sargassum siliquosum* J. Ag. and *Sargassum paniculatum* J. Ag. (Sargassaceae, Phaeophyta) in the reef flat of Balibago. Proc. 5th Coral Reef Congress 5: 51-57.

- BALDWIN B. G.; M. J. ANDERSON; J. M. PORTER; M. F. WOJCIECHOWSKI; C. S. CAMPBELL; M. J. DONOGHUE 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence in angiosperm phylogeny. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 82: 247- 277.
- BELLORÍN, A. M. R.; M. C. OLIVEIRA and E. C. OLIVEIRA 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. *J. Phycol.* 38: 1- 14.
- BIRD C. J. ; E. L. RICE; C. A. MURPHY; M. A. RAGAN 1992. Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. *Phycologia*, 31: 510- 522.
- CATRIONA, M. O. M.; D. A. MORRISON; P. J. RALPH 2005. Temporal and spatial variation in the morphology of the brown macroalga *Hormosira banksii* (Fucales, Phaeophyta). *Botanica Marina* 48: 198-207.
- CHESHIRE A. & J. CONRAN 1995. A cladistic analyses of the evolution and biogeography of *Durvillaea* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 31: 644-655.
- CHESHIRE A. & N. HALLAM, 1989. Morphological differences in the southern bull-kelp (*Durvillaea potatorum*) throughout South-eastern Australia. *Bot. Mar.* 32:191-197.
- DE RUYTER VAN STEVENINCK & A. M. BREEMAN 1987. Population dynamic of tropical intertidal and deep water population of *Sargassum polyceratum* (Phaeophyta). *Aquat. Bot.* 29:139-156.
- DIECK I. T. & E. C. OLIVEIRA 1993. The section *Digitatae* of the genus *Laminaria* (Phaeophyta) in the northern and southern Atlantic: crossing experiments and temperate responses. *Marine Biology* 115: 151-160.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FORTES- XAVIER, A. C. M. 2000. O gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales) no litoral brasileiro. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Depto. de Botânica. 135p.
- FRESHWATER D. W.; S. FREDERICQ; B. S. BUTLER; H. M. HOMMERSAND; M. W. CHASE 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcl*. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 91: 7281- 7285.
- GILLESPIE R. D. & A. T. CRITCHLEY 2001. Assessment of spatial and temporal variability of three *Sargassum* species (Fucales, Phaeophyta) from KwaZulu-Natal, South Africa. *Phycol. Res.* 49: 241-249.
- HALL T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 48:95-98

- HATTACHARYA, D. & L. D. DRUEHL 1989. Morphological and DNA sequence variation in the kelp *Costaria costata* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* 102: 15-23.
- KILAR, J. A. & M. D. HANISAK 1988. Seasonal patterns of morphological variability in *Sargassum polyceratum* (Phaeophyta). *J. Phicol.* 24: 467-473.
- KILAR, J. A. & M. D. HANISAK 1989. Phenotypic variability in *Sargassum polyceratum* (Fucales, Phaeophyta). *Phycologia* 28: 491-500.
- KILAR, J. A. 1992. Seasonal and between-plant variability in the morphology of *Sargassum mathielsonni* sp. nov. (Phaeophyta) from gulf of Mexico. *Journal of Phycology* 28: 114-126.
- KILAR, J. A.; M. D. HANISAK; T. YOSHIDA 1992a. On the expression of phenotypic variability: Why is *Sargassum* so taxonomically difficult? In Abbot, I. A. [Ed.] *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean Species*, Vol. III. California Sea Grant College Program, University of California, La Jolla, California, pp.95-117.
- KILAR, J. A.; T. AJISAKA; T. YOSHIDA, M. D. HANISAK 1992b. A comparative study of *Sargassum polyporum* from the Ryukyu islands (Japan) and *Sargassum polyceratum* from the Florida Keys (United States). In Abbot, I. A. [Ed.] *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean Species*, Vol. III. California Sea Grant College Program, University of California, La Jolla, California, pp. 119-132.
- MILLER, K.; J. OLSEN; W. STAM 2000. Genetic divergence correlates with morphological and ecological subdivision in the deep-water elk kelp, *Pelagophycus porra* (Phaeophyta). *J. Phicol.* 36: 862-870.
- NEEFUS, C.; B. ALLEN; H. BALDWIN; A. MATHIESON; R. ECKERT; C. YARISH; M. MILLER 1993. An examination of the population genetics of *Laminaria* and other brown algae in the Laminariales using starch gel electrophoresis. *Hydrobiologia* 260/261: 67-79.
- NUNES, M. J. de C. 1999. Phaeophyta da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 271p.
- NÚÑEZ-LÓPEZ, R. A. & M. M. CASAS-VALDÉZ 1996. Fenología de las especies de *Sargassum* (Fucales, Sargassaceae) en tres zonas de Bahía Concepción, B. C. S., México. *Rev. Biol. Trop.* 44(2): 455-464.
- OLIVEIRA FILHO, E. C. 1977. Algas marinhas bentônicas do Brasil. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo. 407p.
- PAULA, E. J. & E. C. OLIVEIRA 1982. Wave exposure and ecotypical differentiation in *Sargassum cymosum* (Phaeophyta- Fucales). *Phycologia* 21(2): 145-153.

- PAULA, E. J. 1978. Taxonomia, aspectos biológicos e ecológicos do gênero *Sargassum* (Phaeophyta – Fucales) no litoral do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado), Universidade De São Paulo, 182p.
- PAULA, E. J. 1984. Estudos experimentais de cultivo e hibridação em *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) em condições de laboratório. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, 246 p.
- PAULA, E. J. 1988. O gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim de Botânica* 10: 65-118.
- PAULA, E.J. de & SOUSA, R. F. de 1987 Liberação periódica de gametas em populações naturais, simpátricas de *Sargassum cymosum* e *S. stenophyllum*. VI Mini-Simpósio de Biologia Marinha. Centro de Biologia Marinha - USP, São Paulo, SP. p. 21.
- POSADA D. & CRANDALL K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-8.
- RICE, E. L. & A. R. O. CHAPMAN 1985. A numerical taxonomy of *Fucus distichus*(L.) emend Powell. *J. Mar. Biolol. Assoc. U.K.* 65: 433-459.
- RUSSELL, G. 1978. Variation and natural selection in marine macroalgae. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 24: 309- 377.
- SAITOU N. & NEI M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evolution* 4:406-425.
- SAMBROOK, J.; E. F. FRITSCH; T. MANIATIS 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed.vol. 3 Cold Spring Harbour Laboratories press, New York.
- SERISAWA, Y.; M. AOKI; T. HIRATA; A. BELLGROVE; A. KURASHIMA; Y. TSUCHIYA; T. SATO; H. UEDA; Y. YOKOHAMA 2003. Growth and survival rates of large-type sporophytes of *Ecklonia cava* transplanted to a growth environment with small-type sporophytes. *J. App. Phycol.* 15: 311-318.
- SOGIN M. L.. 1990. Amplification of ribossomal RNA genes for molecular evolution studies. In: INNES, M. A.; D. H. GELFAND; J. J. SNISNKY; T. J. WHITE (eds) , *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, pp 307- 314.
- SWOFFORD, D. L. 2000. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAMURA K. & M.NEI 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.
- TAYLOR, W. R. 1960. *Marine algae for the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas*. Univ. Michigan Press, Ann Arbor, 9+870pp.
- YOSHIDA, T., V. STIGER , T. HORIGUCHI. 2000. *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, *Japan Phycol. Res.*, 48, pp. 125-132.

Capítulo 3

INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS PARA A ORDEM FUCALES BASEADAS EM SEQÜÊNCIAS DO GENE SSU rDNA

I. INTRODUÇÃO

A classe Phaeophyceae inclui organismos multicelulares fotoautótrofos quase que exclusivamente marinhos, com poucos gêneros de água doce. O grupo é popularmente conhecido como algas pardas. Esta classe está inserida no filo Heterokontophyta (van den Hoek *et al.* 1995; Rousseau *et al.* 2001). A denominação desse filo é devida à sua estrutura flagelar, constituída de um flagelo liso e outro composto por duas fileiras de mastigonemas. Evidências moleculares agrupam em um clado monofilético a linhagem das algas heterocontes, também referida como Chromista, mais uma diversidade ampla de organismos dentre os protistas, incluindo grupos não fotossintetizantes. Neste clado agrupam-se desde organismos unicelulares até pluricelulares de dimensões consideráveis, como as “kelps” que atingem até 46 metros de comprimento (Druehl *et al.* 1997).

As análises filogenéticas de regiões gênicas da actina e do SSU rDNA agruparam os organismos autotróficos (com clorofilas a e c), como as algas pardas, diatomáceas e crisófitas, com organismos heterotróficos, tais como fungos das classes Oomycetidae e Labyrinthulomycetidae (Alexopoulos *et al.* 1986; Bhattacharya & Druehl 1988; Bhattacharya *et al.* 1992). O clado que originou as algas pardas apresenta-se em uma linhagem evolutiva distinta dos filos Chlorophyta e Rhodophyta, que incluem outras macroalgas (Figura 3.1.).

À medida que foram intensificados os estudos moleculares para os diversos grupos de macroalgas, tornou-se mais fortalecida a hipótese de que as algas pardas constituem um grupo de organismos evolutivamente recente. Acredita-se que a evolução morfológica dentro do grupo das algas pardas tenha ocorrido de forma muito mais rápida do que dentro das algas vermelhas (Rhodophyta). Van den Hoek *et al.* (1995) compararam a evolução de algas vermelhas e pardas, assumindo aproximadamente a mesma taxa de evolução para o gene SSU rRNA (18S) de ambos os grupos. Os autores destacaram a baixa divergência (0,66%) observada entre sete gêneros da ordem Laminariales nas algas pardas, em relação à divergência (4,5%) observada entre gêneros da ordem Gracilariales

nas algas vermelhas. Considerando uma taxa de divergência de 1% por 25-50 milhões de anos nas seqüências de SSU rRNA, a idade da ordem Laminariales poderia ser estimada em 16-30 milhões de anos (Saunders & Druehl 1992). Tais resultados estão de acordo com Stam *et al.* (1988), que calcularam em 15-20 milhões de anos o período para o surgimento do gênero *Laminaria*, com base em técnicas de hibridação de DNA. As divergências de seqüências entre genomas plastidiais dentro de Laminariales apresentam-se muito mais baixas quando comparadas com aquelas entre gêneros de algas vermelhas proximamente relacionadas (van den Hoek *et al.* 1995).

Figura 3.1. Esquema representando as principais linhagens dos eucariotos e suas relações filogenéticas, baseado em Baudauf (2003).

Os estudos filogenéticos na classe Phaeophyceae ainda não se apresentam totalmente conclusivos acerca das relações entre as diversas ordens. O trabalho de Russell & Fletcher (1975) restringiu-se à flora das Ilhas Britânicas e tentou estabelecer as relações com base na análise numérica. Outros estudos como os de Kylin (1933), Papenfuss (1951), Scagel (1966) e Wynne & Loiseaux (1976), e mais recentemente van den Hoek *et al.* (1995), apresentaram árvores indicando as relações filogenéticas dentro do grupo das algas pardas. Kylin (1933), Scagel (1966) e Wynne & Loiseaux (1976) consideraram Fucales (incluindo *Durvillaea*) como apresentando um ciclo de vida muito peculiar, sendo suficientemente distinto das demais algas pardas, para merecer ser considerada grupo-irmão das demais ordens da classe. Papenfuss (1951) e van den Hoek *et al.* (1995) sugeriram que Ectocarpales seria o grupo ancestral por conta de sua estrutura somática mais simplificada. Van den Hoek & Jahns (1978) e Womersley (1987) apresentaram as relações entre as ordens em um diagrama, no qual Ectocarpales, Chordariales, Dictyosiphonales e Scytosiphonales, representam uma condição ancestral e outras ordens como derivadas destas. Todas estas relações foram estabelecidas utilizando-se poucos caracteres, geralmente apenas aqueles usados para definir as ordens e, no que se refere

às algas pardas, principalmente o tipo de histórico de vida. Kaway (1992) fez uma revisão acerca de células flageladas em algas pardas e concluiu que Scytosiphonales retêm características mais primitivas neste aspecto em relação às demais ordens.

As árvores geradas a partir da morfologia refletem aquilo que os autores julgaram ser os caracteres mais importantes (Bhattacharya, 1997). Sem resolver esta questão subjetiva, a significância filogenética relativa para vários caracteres morfológicos permanece confusa (Rousseau *et al.* 2001).

As análises moleculares, incluindo representantes da ordem Fucales, que utilizaram o SSU rDNA como marcador molecular, foram realizadas em alguns estudos, tais como: Tan & Druehl (1993, 1994 e 1996), Saunders & Kraft (1995), Druehl *et al.* (1997), Medlin *et al.* (1997), van de Peer & de Wachter (1997), Rousseau *et al.* (1997), Andersen *et al.* (1998), Horiguchi & Yoshida (1998), Peters (1998), Peters & Burkhardt (1998), Peters & Clayton (1998), de Reviers & Rousseau (1999), Rousseau & de Reviers (1999a, 1999b), Rousseau *et al.* (2000), Draisma *et al.* (2001) e Rousseau *et al.* (2001). Os seis últimos estudos citados também incluíram o LSU rDNA (28S) nas análises. Não obstante pouco pôde ser concluído acerca das relações filogenéticas do grupo.

Rousseau *et al.* (2001) considerando que nenhum consenso existe acerca de qual sistema de classificação é mais elaborado e reflete a filogenia de algas pardas, realizaram o estudo filogenético mais abrangente para a classe Phaeophyceae. Os autores utilizaram seqüências de SSU e LSU rDNA combinadas em uma análise filogenética compreendendo 67 espécies, representando todas as ordens em 55 famílias. Diversas questões acerca da filogenia das algas pardas podem ser apontadas segundo Rousseau *et al.* (2001), dentre estas, destacam-se aqui aquelas que se referem à ordem Fucales: a) até que ponto o histórico de vida é realmente o principal caráter a ser considerado? b) existe ou não homologia entre os conceptáculos que ocorrem em alguns gêneros como *Ascoseira* (Ascoseirales) em relação à ordem Fucales; e c) em que posição se situa o clado das Fucales? Uma vez que nas análises em que a espécie *Tribonema aequale* (Xanthophyceae) foi utilizada como grupo externo, o clado referente à ordem Fucales situou-se na base das demais algas pardas.

Apesar de não terem conseguido esclarecer todas as questões Rousseau *et al.* (2001) confirmaram que a maioria das ordens reconhecidas de algas pardas constituem linhagens monofiléticas, incluindo Fucales (van den Hoek *et al.* 1995; Rousseau *et al.* 1997, Rousseau & de Reviers 1999b). A mais notável exceção corresponde à ordem Laminariales, a qual é parafilética. Tal resultado já havia sido apontado por outros autores (Druehl & Saunders 1992, Saunders & Druehl 1992). A ordem Ectocarpales tem sido foco de muitos estudos filogenéticos no sentido de revisar a taxonomia de suas famílias. Considerando apenas os critérios da taxonomia clássica, sem o advento da comparação de

seqüências homólogas de marcadores moleculares, este grupo também seria considerado polifilético (Tan & Druehl 1994). Rousseau *et al.* (2001) sugerem que as primeiras divergências durante a evolução da classe Phaeophyceae foram de organismos da ordem Dictyotales, seguidas pelas ordens Sphacelariales e Syringodermatales. Entretanto, estes autores atribuem a baixa resolução das questões referentes às relações entre as ordens a duas possíveis causas: a) a rápida extinção de algumas linhagens ou; b) a necessidade de associar outro marcador molecular às análises, mencionando o estudo realizado por Serrão *et al.* (1999) que utilizaram os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) dos genes que codificam para os rRNA. Draisma *et al.* (2001) sugerem que a despeito do conhecimento acerca da filogenia das algas pardas obtido através de estudos com genes do DNA ribossomal nuclear, os esforços em esclarecer a filogenia deste grupo devem ser no uso dos genes plastidiais *rbcL* e *rbcS*. Estes autores mencionam também que a região espaçadora entre as duas subunidades da Rubisco, pode apresentar forte sinal filogenético para estudos entre ordens, famílias e gêneros.

A ordem Fucales foi descrita por Bory de Saint-Vincent (1827, *apud* Silva & de Reviers 2000) e revisada mais tarde pelo sistema de classificação de Kylin (1933) e subsequentemente por Nizamudin (1962). Nesta última revisão, foram reconhecidas oito famílias: Ascoseiraceae, Cystoseiraceae, Durvillaeceae, Fucaceae, Hormosiraceae, Himanthaliaceae, Sargassaceae e Seirococcaceae. Fucales se distingue das demais ordens por formar elementos reprodutivos em cavidades denominadas conceptáculos e por apresentar um ciclo de vida ainda controverso, considerado como haplobionte diplonte ou pseudodiplontico (van den Hoek *et al.* 1995). Isso porque células vegetativas haplóides que foram observadas envolvendo a oosfera podem ser, ou não, consideradas como um gametófito reduzido (Clayton 1988). A maioria das ordens da classe Phaeophyceae caracteriza-se por apresentar ciclo de vida diplontico. Van den Hoek *et al.* (1995), destacam a ordem Fucales como a mais derivada dentre as demais por apresentar um ciclo com redução extrema da fase gametofítica.

Clayton (1984) realizou um estudo sobre as relações filogenéticas dentro ordem Fucales, com base nos caracteres morfológicos, anatômicos e inerentes ao ciclo de vida, considerando que um provável ancestral para ordem reuniria características semelhantes aos representantes da família Hormosiraceae. Utilizando uma abordagem baseada em filogenia molecular, Saunders & Kraft (1995), através de comparações de seqüências da região SSU rDNA nuclear, consideram a família Northsiaceae (consistindo de um gênero monotípico, *Northsia*), como precursora na história evolutiva de Fucales.

Cho *et al.* (2006) realizaram um estudo inovador no que se refere à escolha do marcador molecular, trabalhando com seqüências do gene plastidial que codifica a apoproteína A1 do fotossistema I (*psaA*) de 42 espécies de Fucales, apesar do marcador já

ter sido utilizado pelos mesmos autores (Cho *et al.* 2004) em um estudo que resultou no estabelecimento da nova ordem Ishigeales (Phaeophyceae). O marcador molecular *psaA* apresentou resultados promissores para esclarecer questões filogenéticas dentro das ordens de algas pardas.

Nos últimos estudos de filogenia dos representantes de Fucales, a questão da distribuição biogeográfica desponta como fundamental para a compreensão da origem deste grupo. As prováveis rotas de dispersão do ancestral, de acordo com os eventos marcantes na história geológica de alguma forma contribuíram para a atual distribuição biogeográfica, marcada por uma clara distinção entre representantes de ocorrência exclusiva ou no hemisfério norte, ou no hemisfério sul (Clayton 1984; Serrão *et al.* 1999; de Reviers & Rousseau 1999b; Cho *et al.* 2006). Serrão *et al.* (1999) caracterizou a família Fucaceae como monofilética por meio de uma análise de parcimônia realizada incluindo seis gêneros. Estes autores sugerem que, para a família Fucaceae, os táxons do hemisfério norte são altamente divergentes em relação àqueles gêneros de ocorrência exclusiva no hemisfério sul, incluindo nesta última categoria, o gênero *Xilophora*. Além disto, demonstraram uma alta variabilidade intra-específica para ITS1 e ITS2 nesta família. Fortemente embasado na distribuição biogeográfica, Cho *et al.* (2006) criaram uma nova família Xiphophoraceae, com o único gênero *Xiphophora*, que anteriormente pertencia a Fucaceae.

A maioria dos estudos de filogenia molecular concentra-se nos gêneros de ocorrência nas regiões temperadas do hemisfério norte. De fato, a maior riqueza de espécies encontra-se no hemisfério norte, porém, apesar de apresentarem menor número de espécies de Fucales, as regiões do hemisfério sul, abrigam em suas águas pistas esclarecedoras para as hipóteses de origem, dispersão e filogenia desta representativa ordem das algas pardas. Considerando-se as regiões tropicais do hemisfério sul, destacam-se alguns representantes de Fucales, dentre os quais o gênero *Sargassum* se destaca. No presente estudo foram seqüenciados os genes da SSU rDNA de cinco táxons infra-genéricos do subgênero *Sargassum*, os quais podem contribuir nos estudos referentes à filogenia do grupo das Fucales. Foram incluídas as seqüências de SSU rDNA de Rousseau *et al.* (2001) disponíveis no GenBank em conjunto com as seqüenciadas nesta tese.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada neste capítulo encontra-se descrita no capítulo 2. As espécies seqüenciadas neste estudo foram alinhados com espécies contidas no GenBank (Tabela 3.1). Para as análises filogenéticas foram construídas matrizes distintas a partir das seqüências de SSU rDNA: uma matriz de alinhamento com a seqüência parcial do SSU rDNA com 451 posições e 25 táxons; e uma matriz construída com seqüências completas

do SSU rDNA com 1787 posições e 10 táxons representantes de Fucales. Para estas análises foram utilizados os alinhamentos dos táxons infragenéricos *Sargassum cymosum* var. *cymosum*, *Sargassum cymosum* var. *nanum*, *S. furcatum*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare* seqüenciados neste trabalho, designados conjuntamente de *Sargassum* Atlântico Sul (AS).

III. RESULTADOS

O SSU rDNA foi seqüenciado para os táxons infragenéricos de quatro espécies, *Sargassum cymosum* (incluindo as duas variedades), *S. furcatum*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare*. O SSU rDNA dos táxons analisados apresenta 1751 pares de bases (Anexo 3.A), excluindo os primers de amplificação por PCR (Tabela 2.4). Estas são as primeiras seqüências obtidas para espécies de *Sargassum* do Atlântico Sul (AS).

A comparação entre as seqüências de SSU rDNA obtidas para as espécies de *Sargassum* do Brasil realizadas nesta tese mostrou 100% de identidade entre as quatro espécies referidas acima. Assim, o conjunto destas foi designado nos terminais das árvores como *Sargassum* AS. Foi realizada uma tentativa de alinhar seqüências da região ITS2 de espécies da ordem Fucales, porém, o ITS2 apresentou um alto grau de divergência para as espécies desta ordem, impedindo a obtenção de um alinhamento confiável.

No sentido de integrar o maior número possível de espécies para representar a relação filogenética entre as famílias da ordem Fucales, foi feita uma matriz com seqüências parciais de SSU rDNA (451 posições). Uma outra matriz utilizou o SSU rDNA completo (1787 posições) com uma menor representação de cada família, uma vez que o gene completo foi seqüenciado apenas para poucos representantes da ordem. Os resultados de ambas as análises feitas com alinhamentos SSU rDNA, parcial (Figura 3.2) e completo (Figura 3.3), apontam para o monofiletismo da família Sargassaceae com valores de “bootstrap” de 100% em todos os métodos de análise.

1. Alinhamento de seqüências parciais de SSU rDNA (451 posições)

As 25 seqüências de espécies utilizadas nesta análise representam as famílias Durvillaeaceae, Fucaceae, Himanthaliaceae, Sargassaceae, Seirococcaceae. Representantes de Desmarestiales (*Desmarestia viridis*), Ectocarpales (*Ectocarpus siliculosus*) e Laminariales (*Laminaria angustata*) foram utilizados como grupos externos desta análise. Nestes resultados, devido ao tamanho da árvore as análises de “neighbour-joining” (NJ) e máxima parcimônia (MP) foram feitas com “bootstrap” e a de máxima verossimilhança (ML) foi representada por uma única árvore que apresenta a mesma

distribuição de ramos (não incluída). Todas as análises mostraram que as famílias Sargassaceae, Fucaceae, Durvillaeaceae e Seirococcaceae formam grupos monofiléticos. Os valores de “bootstrap” variaram de moderado a alto para essas famílias de Fucales. A família Sargassaceae está representada por um ramo monofilético com alto valor de “bootstrap” (100%) composto por uma politomia incluindo *Sargassum* AS, *S. thunbergii*, *S. horneri*, *Myagropsis myagroides*, *Cystoseira hakodatensis*, *C. noicaulis*, *Coccophora langsdorfii*, *Bifurcaria bifurcata*, *B. brassicaeformis*, *Axillariella constricta* e um ramo basal contendo *Turbinaria turbinata*, mas com baixo valor de “bootstrap”.

Tabela 3.1: Conjunto de táxons utilizados na montagem das duas matrizes de SSU rDNA utilizadas nas inferências para as famílias. As abreviações encontradas são: M1- matriz com 451 posições e 25 táxons; M2- matriz com 1787 posições e 10 táxons e ; Grupo externo (GE)

Nome da espécie	Familia/ GE Ordem	Registro Genbank/ MATRIZ (M)
<i>Himanthalia elongata</i>	Himanthaliaceae	AFO91287 (M1)
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	AF091288 (M1)
<i>Xiphophora chondrophylla</i>	Xiphophoraceae	AF091289 (M1)
<i>Durvillaea potatorum</i>	Durvillaeaceae	AFO91290 (M1)
<i>Seirococcus axillaris</i>	Seirococcaceae	AFO91291 (M1)
<i>Bifurcaria brassicaeformis</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	AFO91292 (M1)
<i>Axillariella constricta</i>	Sargassaceae	AFO91293 (M1)
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucaceae	AF091296 (M1)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Fucaceae	AF091297 (M1)
<i>Turbinaria turbinata</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	AF091300 (M1)
<i>Bifurcariopsis capensis</i>	Bifurcariopsidaceae	AF130704 (M1)
<i>Cystoseira nodicaulis</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	AF130705 (M1)
<i>Durvillaea antarctica</i>	Durvillaeaceae	AF130706 (M1)
<i>Cystophaera jacquinotii</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	AF130707 (M1)
<i>Pelvetia canaliculata</i>	Fucaceae	AF130708 (M1)
<i>Phyllospora comosa</i>	Seirococcaceae	AF130710 (M1)
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (GE)	Ectocarpaceae/Ectocarpales	AY307398 (M1)
<i>Lammaria angustata</i> (GE)	Laminariaceae/ Laminariales	ABO22818 (M1/ M2)
<i>Desmarestia viridis</i> (GE)	Desmarestiaceae/ Desmarestiales	AJ295828 (M1/ M2)
<i>Myagropsis myagroides</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	ABO11427 (M1/ M2)
<i>Cystoseira hakodatensis</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	ABO11425 (M1/ M2)
<i>Coccophora langsdorfii</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	ABO11426 (M1/ M2)
<i>Hizikia fusiformis</i>	Sargassaceae (<i>senso lato</i>)	ABO11428 (M1/ M2)
<i>Sargassum macrocarpum</i>	Sargassaceae	ABO11432 (M1/ M2)
<i>Sargassum horneri</i>	Sargassaceae	ABO11429 (M1/ M2)
<i>Sargassum thunbergii</i>	Sargassaceae	DQ666484 (M1/ M2)

Figura 3.2. Árvore de máxima parcimônia (MP) do SSU rDNA (451 posições). Os valores de bootstrap, efetuados para 1000 replicatas, estão indicados: acima do ramos os valores de MP e abaixo (com fundo preto) os valores de neighbour-joining (NJ). As famílias estão indicadas para cada grupo.

As famílias Himanthaliaceae, representada por *Himanthalia elongata*, e Xiphophoraceae representada por *Xiphophora chondrophylla* formam juntamente com a família Fucaceae um agrupamento monofilético com valor moderado de “bootstrap” (71% MP e 73% NJ). Esse agrupamento tem como grupo irmão a nova família Bifurcariopsidaceae representada por *Bifurcariopsis capensis*, formando um agrupamento monofilético com alto valor de “bootstrap” (99% MP e NJ). A família Fucaceae representada por *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* e *Pelvetia caniculata* forma um agrupamento monofilético com valores de “bootstrap” de moderado a alto (73% MP e 92% NJ). A família Durvillaeaceae, representada pelas espécies *Durvillaea potatorum* e *D. antarctica*, formou um grupo monofilético sustentado com valores de “bootstrap” moderado a alto (87% MP e

99% NJ). A família Seirococcaceae encontra-se representada pelas espécies de seus únicos três gêneros, *Seirococcus axillaris*, *Cystophaera jacquiniotii* e *Phyllospora comosa*, forma um agrupamento monofilético com altos valores de “bootstrap” (100% NJ e 92% MP).

2. Alinhamento de seqüências completas de SSU rDNA (1787 posições)

Nesta análise a ênfase foi direcionada à família Sargassaceae, com 10 seqüências completas para o SSU rDNA representando dois subgêneros de *Sargassum*, (*Bactrophycus* e *Sargassum*) e os representantes dos gêneros *Hizikia*, *Myagropsis*, *Cystoseira*, *Coccophora* e, como grupo externo, espécies de *Laminaria* e *Desmarestia*.

Figura 3.3. Árvore de máxima verossimilhança (ML) do SSU rDNA (1787 posições). Os valores de bootstrap, efetuados para 1000 replicatas, estão indicados: acima dos ramos os valores de ML e abaixo: a) com fundo preto- os valores de máxima parcimônia (MP) e b) com fundo branco- os valores de neighbour-joining (NJ).

Os gêneros *Sargassum*, *Hizikia* e *Myagropsis* formam um agrupamento monofilético em todas as análises com valores de “bootstrap” moderados (83% ML, 75% NJ e 86% MP). Em todas as análises as espécies representantes dos gêneros *Cystoseira* e *Coccophora*

formaram um grupo monofilético com valores de “bootstrap” moderados (78% NJ; 77% MP e 83% ML).

IV. DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam o monofiletismo da ordem Fucales. Esta ordem foi representada pelas famílias Durvillaeaceae, Fucaceae, Himanthaliaceae, Sargassaceae (*sensu lato*), Seirococcaceae (Guiry *et al.* 2006). Foram incluídos também representantes da antiga família Cystoseiraceae (*Myagropsis myagroides*, *Cystoseira hakodatensis*, *Cystoseira nodicaules* e *Coccophora langsdorfii*). Os resultados corroboram o que já havia sido defendido por Horiguchi & Yoshida (1998) que questionaram a manutenção da espécie *Myagropsis myagroides* na família Cystoseiraceae e incluem o gênero em Sargassaceae. Finalmente, Rousseau & de Reviers (1999b) que consideraram todos os representantes da família como Sargassaceae (*sensu lato*). Exceto o gênero *Bifurcariopsis*, o qual preferiram não incluir em Sargassaceae (*sensu lato*). Draisma *et al.* (2003) sugerem que o gênero *Bifurcariopsis* seja estabelecido em uma nova família que foi recentemente proposta como Bifurcariopidaceae (Cho *et al.* 2006). Os resultados encontrados por Cho *et al.* (2006) colocam essa família como grupo-irmão de Himanthaliaceae. Alguns autores como Gomes & Ribeira (2005) ainda consideram a existência da família Cystoseiraceae, apesar do conjunto de resultados mencionados acima ter sido confirmado por diferentes marcadores moleculares: nucleares (Horiguchi & Yoshida 1998; Rousseau *et al.* 2001; Draisma *et al.* 2003 e; Capítulos 3 e 4) e plastidiais (Draisma *et al.* 2003, Cho *et al.* 2006 e Capítulo 4).

A família Sargassaceae (*sensu lato*) foi representada por um clado monofilético com valores máximos de “bootstrap” (100%) em todos os métodos de análise. Entretanto, os diferentes gêneros formam uma politomia o que assinala que este marcador molecular não apresenta informação suficiente para esclarecer as relações filogenéticas entre os gêneros. Conforme já esperado e estabelecido por Stiger *et al.* (2003) a espécie representante do gênero *Hizikia* foi agrupada em todas as análises dentre as espécies de *Sargassum* (Capítulo 4).

Os grupos representando as famílias Durvillaeaceae e Seirococcaceae encontram-se fortemente embasados por altos valores de “bootstrap” (o menor valor, considerado moderado foi de 87% para a família Durvillaeaceae no método de parcimônia) de acordo com o que tem sido reportado nos artigos de revisão em Fucales (Rousseau *et al.* 2001; Draisma *et al.* 2003; Cho *et al.* 2006).

A família Fucaceae encontra-se representada com valores de “bootstrap” de moderado à alto nas árvores geradas neste estudo. O gênero *Xiphophora* originalmente incluído na família foi recentemente inserido em uma família própria, Xiphophoraceae

(Cho *et al.* 2006). Os resultados deste capítulo corroboram aqueles encontrados por Rousseau & de Reviers (1999b) e Draisma *et al.* (2003) também com marcadores nucleares do rDNA.

As hipóteses de dispersão de espécies ancestrais, embasada por datações e hipóteses biogeográficas são discutidas por Serrão *et al.* (1999) utilizando ITS1, 5,8S e ITS2 e por Cho *et al.* (2006) que sugeriu *psaA* como um novo marcador molecular a ser utilizado para as algas pardas. Ambos os trabalhos ressaltam que tal abordagem apresenta informações fundamentais para compreensão da filogenia das famílias em Fucales. Neste sentido, faz-se necessário um investimento assertivo no conhecimento da filogenia molecular e estudos populacionais de gêneros representativos dos hemisférios sul e norte. O gênero *Fucus* constitui em um exemplo de tal investimento em conhecimento.

Este trabalho apresenta o primeiro seqüenciamento de SSU rDNA para o gênero *Sargassum* no Atlântico Sul, onde, o conhecimento acerca da filogenia molecular das algas pardas é também pioneiro.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; C. W. MIMS & M. BLACKWELL. 1996. Introductory Mycology. 4ª ed.; John Wiley & Sons, New York, 869 p.
- ANDERSEN, R. A.; D. POTTER; R. R. BIDIGARE; M. LATASA; K. ROWAN; C. J. O'KELLY 1998. Characterization and phylogenetic position of the enigmatic golden alga *Phaeothamnion confervicola*: ultrastructure, pigment composition and partial SSUrDNA sequence. *J. Phycol.* 34: 286-298.
- BAUDAUF, S.L. 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* 300:1703-1706.
- BHATTACHARYA, D.; L. MEDLIN; P.O. WAINRIGHT, E. ARIZTIA; C. BIBEAU; S. STICKEL, M. SOGIN 1992. Algae containing chlorophylls a + c are paraphyletic: Molecular evolutionary analysis of the Chromophyta *Evolution* 46: 1801- 1817.
- BHATTACHARYA, D.; L. D. DRUEHL 1988. Phylogenetic comparison the small-subunit ribosomal DNA sequence of *Costaria costata* (Phaeophyta) with those algae, vascular plants and oomycetes. *J. Phycol.* 24: 539- 543.
- CHO, G. Y.; F. ROUSSEAU; B.DE REVIERS; S.M. BOO 2006. Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding *psaA* sequences. *Phycologia*, 45 (5): 512-519.
- CLAYTON, M. N. 1984. Evolution of the Phaeophyta with particular reference to the Fucales, *Progress in Phycological Research*, 3: 11- 46.
- CLAYTON, M. N. 1988. Evolution and life histories of brown algae. *Botanica Marina* 31: 379-387.

- DE REVIERS, B.; F. ROUSSEAU 1999. Towards a new classification of the brown algae, *Prog. Phycol. Res.*, 13: 107- 201.
- DRAISMA, S. G. A.; A. F. PETERS, R. L. FLETCHER 2003. Evolution and taxonomy in the Phaeophyceae: Effects of the molecular age on brown algal systematics, *Out of the Past: Collected Reviews to Celebrate the Jubilee of the British Phycological Society*, pp. 87- 102.
- DRAISMA, S. G. A.; W. F. PRUD'HOMME VAN REINE, W. T. STAM, J. L. OLSEN 2001. A reassessment of phylogenetic relationships within the Phaeophyceae based on rubisco large subunit and ribosomal DNA sequences, *Journal of Phycology*, 37: 586-603.
- DRUEHL L. D. & G. W. SAUNDERS 1992. Molecular explorations in kelp evolution. In *Progress in Phycological reseach*, vol 8, ed. F. E. Round & Chapman, pp.47-83. Biopress Bristol.
- DRUEHL L. D.; C. MAYES; I. H. TAN and G. W. SAUNDERS 1997. Molecular and morphological phylogeny of kelp and associated brown algae. In: Bhattacharya D. [Ed], *Origin of algae and their plastids*, Springer, Wien, New York, pp. 221- 235.
- GUIRY M. D.; N. E. DHONNCHA; F. RINDI 2006. AlgaeBase version 3.0. National University of Ireland, Galway. In: <http://www.algaebase.org> acessado em 15/09/2006.
- HORIGUCHI T. & T. YOSHIDA 1998. The phylogenetic affinities of *Myagropsis myagropsis* (Fucales, Phaeophyceae) as determined from 18S rDNA sequences. *Phycologia* 37: 237-245.
- KYLIN, H. 1933. Über die Entwicklungsgeschichte der Phaeophyceen. Lunds Univ. Årsskr., N. F., Avd. 2 29 (7).,
- MEDLIN, L.K., W. H. C. F. KOOISTRA; D. POTTER; G. W. SAUNDERS; R. A. ANDERSEN 1997. Phylogenetic relationships of the "golden algae" (haptophytes, heterokont chromophytes) and their plastids .*Plant Syst. Evol.* 11 (suppl): 187-216..
- NIZAMUNDDIN, M. 1962. Classification and the distribution of the Fucales. *Botanica Marina*, hamburg, 4: 191-203.
- PAPENFUSS G. F. 1951. Problems in the classification of the marine algae, *Svensk Bot. Tidskr.* 45: 4- 11.
- PETERS, A. F. Ribosomal DNA sequences support taxonomic separation of the two species of *Chorda*: Reinstatement of *Halosiphon tomentosus* (Lyngbye) Jaasund (Phaeophyceae, Laminariales) (1998), *European Journal of Phycology*, 33: 65- 71.
- PETERS, A. F.; M. N. CLAYTON 1998. Molecular and morphological investigations of three brown algal genera with stellate plastids: Evidence for Scytothamnales ord. Nov. (Phaeophyceae) *Phycologia*, 37: 106- 113.

- PETERS, A.F., E. BURKHARDT 1998. Systematic position of the kelp endophyte *Laminarionema elsbetiae* (Ectocarpales sensu lato, Phaeophyceae) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences *Phycologia*, 37: 114-120.
- ROUSSEAU F. & B. DE REVIERS; M. C. LECLERC; A. ASENSI; R. DELÉPINE 2000. Adenocystaceae fam. nov. (Phaeophyceae) based on morphological and molecular evidence. *Eur. J. Phycol.*, 35: 35-43.
- ROUSSEAU F; B. DE REVIERS 1999a. Circumscription of the order Ectocarpales (Phaeophyceae): Bibliographical synthesis and molecular evidence *Cryptogamie Algologique*, 20: 5- 18.
- ROUSSEAU F; B. DE REVIERS 1999b. Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) based on combined partial SSU + LSU rDNA sequence data, *European Journal of Phycology*, 34: 53- 64.
- ROUSSEAU, F., M. C. LECLERC; B. DE REVIERS 1997. Molecular phylogeny of European Fucales (Phaeophyceae) based on partial large-subunit rDNA sequence comparison *Phycologia*, 36: 438-446.
- ROUSSEAU, F.; R. BURROWES; A. F. PETERS, R. KUHLENKAMP; B. DE REVIERS 2001. A comprehensive phylogeny of the Phaeophyceae based on nrDNA sequences resolves the earliest divergences. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/ Life Sciences* 342: 305-319.
- RUSSELL, G.; R. L. FLETCHER 1975. A numerical taxonomic study of the British Phaeophyta, *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 55: 763-783.
- SAUNDERS G. W. & L. D. DRUEHL 1992. Nucleotide sequences of the small-subunit ribosomal RNA genes from selected Laminariales (Phaeophyta): implications for kelp evolution. *Journal of Phycology* 28:544-549.
- SAUNDERS, G. W.; KRAFT, G. T. 1995. The phylogenetic affinities of *Notheia anomala* (Fucales, Phaeophyceae) as determined from partial small-subunit rRNA gene sequences *Phycologia*, 34: 383- 389.
- SERRÃO E. A.; L. A. ALICE; S. H. BRAWLEY 1999. Evolution of Fucaceae (Phaeophyceae) inferred from nrDNA-ITS. *Journal of Phycology* 35: 382-394.
- SILVA, P.C.; B. DE REVIERS 2000. Ordinal names in the Phaeophyceae, *Cryptogamie, Algologie*, 21: 49- 58.
- STAM, W. T.; P. V. M. BOT; S. A. BOELE-BOS; J. M. van ROOY; C. van den HOEK 1988. Single-copy DNA-DNA hybridization among five species of *Laminaria* (Phaeophyceae): phylogenetic and biogeographic implications. *Helgol. Meeresunters.* 42: 251-267.
- TAN, I. H.; L. D. DRUEHL 1994. A molecular analysis of *Analipus* and *Ralfsia* (Phaeophyceae) suggests the order Ectocarpales is polyphyletic, *J. Phycol.*, 30: 721-729.

- VAN DE PEER, Y.; R. DE WACHTER 1997. Evolutionary relationships among eucaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18 rRNA, *J. Mol. Evol.* 45: 619-630.
- VAN DEN HOEK, C.; D. MANN; H. M. JAHNS 1995. *Algae. An introduction to the phycology.* Cambridge University Press, Cambridge. 627p.
- VAN DEN HOEK, C.; H. M. JAHNS 1978. *Algen. Einführung in die Phykologie*, Thieme, Stuttgart.
- WOMERSLEY, H. B. S. 1954. Australian species of *Sargassum* subgenus *Phyllotrichia*. *Australian Journal of Botany*, 2: 337- 54.

Alinhamento de seqüência

Anexo 3.A

Alinhamento das seqüências completas da SSU rDNA (estrutura primária) dos táxons infragenéricos: *Sargassum vulgare* (Svul), *S. cymosum* var. *cymosum* (Scymc), *S. cymosum* var. *nanum* (Scymn), *S. stenophyllum* (Sste) e *S. furcatum* (Sfur). As posições idênticas foram identificadas por pontos. Os números acima dos nucleotídeos representam a posição neste alinhamento. Os primers das pontas 5´ e 3´ foram trimados das seqüências, sendo assinalados com letras minúsculas os seguintes primers “forward”: 530F) e 1055F. Os primers “reverse” encontram-se com moldura em preto, assim a seqüência da matriz 1, contendo 25 espécies.

```

      570      580      590      600      610      620      630
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  GTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTGTGGCGCGGTCGTCCGGCGGGGCTTCCGGTTTCATAGTATCCCGGG
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      640      650      660      670      680      690      700
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  GCCGTTTGTCTGGGTTCCTTGGCCGCCCATTCCTTCGGTTGCGTGTGCTGGCATTAGGTTGTCGGCTTCT
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      710      720      730      740      750      760      770
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  TCCGCCCGATCGTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTAGGCCGTGGATACATTAGCA
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      780      790      800      810      820      830      840
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  TGGAAATAATGAGATAGGGCCACGCGGTCTATTTTGTGGTTTGCACGTTGTGGTAATGATTACAGGAA
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      850      860      870      880      890      900      910
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  CCGTTGGGGGTATTCGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTATGGAAGACGAACACTCGCA
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      920      930      940      950      960      970      980
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  AAGCATTTACCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCAT
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      990      1000     1010     1020     1030     1040     1050
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  CGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATTGGCGGTCGTTAACCTACAGGACTCCGTCAGCACC
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  TTCCGAGAAATCAAGATCTTTGGGTTCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGAC
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

      1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190
Svul  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Scymc  GGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCGGG
Scymn  .....
Sste   .....
Sfur   .....

```

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Svul	ACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTggtggtgeatggccgTTCCTAG						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
Svul	TTGGTGGAGTGATTGTCTGGTTAATTCGGTTAACGAACGAGACCCCGCCTGCTAAATAGCGTGGCTTA						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
Svul	CGCATTCGCGTAGGTGGGCGCTTCTTAGAGGGACTTTCGGTGACTAACCGAAGGAGTTGGGGGCAATAA						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
Svul	CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCGGCACGCGCGCTACACTGATGCATGCAACGAGTTCCTTT						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
Svul	TTTCCCTGGGTTCGAGAGGCTCGGGTAATCTTTGGAACGTGCATCGTGATAGGGATAGATCATTGCAACTA						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
Svul	TTGATCTTGAAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAGTCATCAGCTCGCATTGATTACGTCCTGCCCTTG						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Svul	TACACACGCCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGTTTCGGTGAAGATTCCGGACCGCGACGCCAGAGCGCT						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
Svul	TCACGGCGCCCTGGTTCGTGGGAAGTTGTCTAAACCTCAACATTAGAGGAAGGTGAAGTCGTAAACAAGGT						
Scymc							
Scymn							
Sste							
Sfur							

Capítulo 4

FILOGENIA DO GÊNERO *Sargassum* (FUCALES, PHAEOPHYCEAE) BASEADA NA COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES ESPAÇADORAS ITS2 e *rbcLS* DE ESPÉCIES DO INDO-PACÍFICO E ATLÂNTICO

I INTRODUÇÃO

O estudo filogenético do gênero *Sargassum* pode ser considerado um grande desafio. Este gênero destaca-se entre as algas pardas, sendo considerado um dos gêneros de distribuição mais ampla das regiões tropicais e subtropicais (Yoshida 1983). Os últimos resultados de trabalhos nesta área, abrangendo as algas pardas, em especial nas ordens Fucales e Laminariales, têm apontado para a intensificação de estudos de biologia molecular e testes de hibridação para explicar o “continuum” de variabilidade morfológica observada nesses grupos. Estes trabalhos sugerem que as espécies nesses grupos divergiram recentemente ou ainda estão em pleno processo de divergência (Serrão *et al.* 1999). Portanto, os marcadores moleculares que usualmente são eficientes no nível inter-específico para outros grupos de algas, mostram-se ainda tão conservados que não apresentam sinal filogenético evidente. Pode-se dizer que a abordagem molecular para este gênero inicia os primeiros passos na definição de marcadores moleculares mais adequados para o grupo.

Os primeiros estudos de com enfoque molecular para o gênero *Sargassum* foram feitos na tentativa de esclarecer a diversidade genética e identificação de espécies (Lim *et al.* 1983). Os autores utilizaram como marcador molecular sequências do gene 5S rRNA para avaliar diversidade gênica em cinco espécies de algas pardas e incluíram *Sargassum fulvellum* (Turner) C. Agardh. Pouco mais que uma década depois, Ho *et al.* (1995a, 1995b) utilizaram análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso (“random amplified polymorphic DNA” – RAPD) para provar a identificação de espécies do *Sargassum* procedentes da região costeira do Indo-Pacífico. Os autores não obtiveram resultados conclusivos e sugeriram o uso da técnica em extensos estudos populacionais, com um maior número de amostras na tentativa de avaliar a variabilidade fenotípica observada.

Yoshida *et al.* (2000) compararam sequências de quatro espécies do subgênero *Bhactrophyucus* para uma análise inter-específica, utilizando como marcador molecular o

ITS2. Neste estudo, os autores classificaram uma nova espécie, denominada *Sargassum boreale* Yoshida et al. (2000). Para a classificação os autores basearam-se em diferenças morfológicas, padrão de distribuição geográfica, substituição de base e presença de um longo indel (100 pares de bases) entre as seqüências homólogas. Stiger et al. (2003) encontraram 100% de identidade para o marcador ITS2 entre 11 espécies de morfologia contrastante, todas pertencentes ao subgênero *Bacthrophycus*.

Na tentativa de estabelecer um marcador molecular eficiente que propiciasse as identificações moleculares e a inferência filogenética para o gênero, Phillips et al. (2005) realizaram um estudo incluindo algumas espécies do gênero *Sargassum* do Atlântico Norte, utilizando a região que codifica para a subunidade grande (*rbcL*) da enzima ribulose 1, 5- bifosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), bem como da região espaçadora entre as subunidade pequena (*rbcS*) e grande da Rubisco, também denominada *rbcLS*. Vale ressaltar que diferentemente das algas verdes em que tais subunidades encontram-se separadas dentro da célula, respectivamente no núcleo e no cloroplasto, nas algas pardas e vermelha os genes *rbcL* e *rbcS* ocorrem no genoma plastidial (Fujiwara et al. 1993, Bhattacharya & Medlin 1995).

A região espaçadora intergênica (*rbcLS*) tem sido freqüentemente empregada em análises moleculares em representantes das algas vermelhas na comparação de populações isoladas de diferentes regiões biogeográficas e/ou em reconstruções filogenéticas inter e intra específicas devido a alta variabilidade nessa região (Maggs et al. 1992, Goff et al 1994, Zucarello & West 1997; Milstein 2006).

No presente estudo, foram analisadas cinco seqüências de ITS2 e três da região do espaçador intergênico *rbcLS* de espécies do Atlântico Sul que foram comparadas com seqüências disponíveis no GenBank. As espécies seqüenciadas para ITS2 foram *S. furcatum*, *S. cymosum*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare*. Para a espécie *S. cymosum* foram seqüenciadas ambas variedades de morfologia bastante diversa, *S. cymosum* var. *cymosum* e *S. cymosum* var. *nanum*. Nas análises realizadas com a região do espaçador intergênico *rbcLS* foram seqüenciadas as espécies *S. vulgare*, *S. filiendula* e *S. stenophyllum*.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada neste capítulo encontra-se descrita no capítulo 2. As matrizes construídas a partir das seqüências do ITS2 e do *rbcLS* das espécies de *Sargassum* obtidas neste trabalho, designados conjuntamente de *Sargassum* Atlântico Sul (*Sargassum* AS), foram alinhadas com as respectivas seqüências de cada marcador molecular disponíveis no GenBank. A lista das espécies com seus números de acesso no GenBank encontra-se apresentada nas Tabelas 4.1 e 4.2. Para as análises filogenéticas

foram construídas matrizes distintas a partir das seqüências de *rbclS* (26 táxons e 618 posições) e ITS2 (42 táxons e 651 posições).

Tabela 4.1: Táxons incluídos na matriz de alinhamento para as seqüências do marcador molecular nuclear ITS2. Grupo externo: *Turbinaria ornata*. NI corresponde a designação de não incluído.

Nome da espécie	Subgênero	Coleção/Local	Registro Genbank	Referência
<i>S. boryii</i>	<i>Phyllotrichia</i>	Larengnière, Nova Caledônia	AB043121	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. pipuliferum</i>	<i>Phyllotrichia</i>	Katsu-ura, Chiba, Japão	AB043617	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. stolonifolium</i>	desconhecido	Plau Jerenak, Malasia	AB043613	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. myriocystum</i>	<i>Sargassum</i>	Zanpa-misaki, Okinawa, Japão	AB043113	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. polycystum</i>	<i>Sargassum</i>	Cau Da, Nhatrang, Vietnã	AB043114	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. macclurei</i>	<i>Bactrophycus</i>	Hon Tre, Nhatrang, Vietnã	AB043111	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. duplicatum</i>	<i>Sargassum</i>	Nanwan, Taiwan	AY315637	Lee, T.-M. & Chen, Unpublished
<i>S. crassifolium</i>	<i>Sargassum</i>	Pulau Redang, Toremanganu, Malaysia (GB)	AB043118	Stiger, V. & Horigu Published only in Database (2000)
<i>S. mangarevense</i>	<i>Sargassum</i>	Tahiti, Polinésia Francesa	AB043119	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. carpophyllum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Ooseto, Nagasaki, Japão	AB043067	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. alternato-pinnatum</i>	<i>Sargassum</i>	Takahama, Nagasaki, Japão	AB043616	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. thunbergii</i>	<i>Bactrophycus</i>	Coréia do Sul	AY150004	Oak, J. H., Suh, Y. And Lee, I. K. Unpublished
<i>S. yezoense</i>	<i>Bactrophycus</i>	Coréia do Sul	AY150017	Oak, J. H., Suh, Y. And Lee, I. K. Unpublished
<i>S. siliquastrum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Isolate C- cultivo Coreia do Sul	AY150015	Oak, J. H., Suh, Y. And Lee, I. K. Unpublished
<i>S. sociale</i>	<i>Sargassum</i>	Rarotonga, Cook Island, Fiji	AB043615	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. nigrifolium</i>	<i>Bactrophycus</i>	Katsu-ura, Chiba, Japão	AB043110	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. muticum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Mangoku-ura, Miyagi, Japão	AB043774	Stiger, V. . & Horigu Published only in Database (2000)
<i>S. gigantefolium</i>	<i>Bactrophycus</i>	Talo flutuante, Chiba, Japão	AB043608	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. confusum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Isolate B – cultivo Coréia do Sul	AY150001	Oak, J. H., Suh, Y. And Lee, I. K. Unpublished
<i>S. filicinum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Amakusa Island, Kumamoto, Japão	AB043108	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. boreale</i>	<i>Bactrophycus</i>	Aininkappu, Hokkaido, Japão	AB038270	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>S. hemiphyllum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Coréia do Sul	AY150006	Oak, J. H., Suh, Y. And Lee, I. K. Unpublished

<i>S. horneri</i>	<i>Bactrophycus</i>	Katsu-ura, Chiba, Japão	AB043776	Stiger, V. . & Horigu Published only in Database (2000)
<i>S. micracanthum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Isolate B – cultivo, Coréia do Sul	AY150010	Oak, J. H., Suh, Y. And Lee, I. K. Unpublished
<i>S. miyabei</i>	<i>Bactrophycus</i>	Rishiri Island, Hokaido, Japão	AB043105	Yoshida, T., Stiger, V., Horiguchi, T., 2000
<i>S. serratifolium</i>	<i>Bactrophycus</i>	Takahama, Nagasaki	AB043612	Stiger <i>et al.</i> , 2003
<i>Sargassum yendoi</i>	<i>Phyllotrichia</i>	Tateyama, Chiba, Japão	AB043667	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>Sargassum duplicatum</i> 2	<i>Sargassum</i>	Hii-zaki, Wakayama, Japão	AB043614	Stiger <i>et ai.</i> 2003
<i>Sargassum crassifolium</i> 2	<i>Sargassum</i>	Zanpa-misaki, Okinawa, Japão	AB043117	Stiger <i>et ai.</i> 2003
<i>Sargassum sociale</i> 2	<i>Sargassum</i>	Tahiti, Polinésia Francesa	AB043120	Stiger <i>et ai.</i> 2003
<i>Sargassum patens</i>	<i>Schizophycus</i>	Takahama, Nagasaki, Japão	AB043666	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. muticum</i> 2	<i>Bactrophycus</i>	Nagatsu-ura, Miyagi, Japão	AB043503	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. muticum</i> 3	<i>Bactrophycus</i>	Katsu-ura, Chiba, Japão	AB043504	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. confusum</i> 2	<i>Bactrophycus</i>	Tsuyazaki, Fukuoka, Japão	AB038271	Yoshida, <i>et al.</i> 2000 ; Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. hemiphyllum</i> 3	<i>Bactrophycus</i>	Tateyama, Chiba, Japão	AB043576	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. horneri</i> 2	<i>Bactrophycus</i>	Mangoku-ura, Miyagi, Japão	AB043569	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. horneri</i> 3	<i>Bactrophycus</i>	Amakusa Island, Kumamoto, Japão	AB043109	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. micracanthum</i> 2	<i>Bactrophycus</i>	Takahama, Nagasaki, Japão	AB043610	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>Sargassum ammophilum</i>	<i>Bactrophycus</i>	Banda, Chiba, Japão	AB043505	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>Sargassum fulvellum</i> 1	<i>Bactrophycus</i>	Coréia do Sul	AY150005	Oak, J. H., Suh, Y.; Lee, I. K. (Unpublished)
<i>Sargassum fulvellum</i> 2	<i>Bactrophycus</i>	Nomozaki, Nagasaki, Japão	AB043572	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>Sargassum microceratium</i>	<i>Bactrophycus</i>	Niigata, Japão	AB038273	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>Hizikia fusiformis</i>	<i>Bactrophycus</i>	Coréia do Sul	AY150021	Oak, J. H., Suh, Y. & Lee, I. K. (Unpublished)
<i>Hizikia fusiformis</i>	<i>Bactrophycus</i>	Hakodate, Hokkaido, Japão	AB043501	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>Myagropsis myagroides</i>	GE-Sargassaceae	Coréia do Sul	AY150022	Oak, J. H., Suh, Y. & Lee, I. K. (Unpublished)
<i>Turbinaria ornata</i>	GE-Sargassaceae	Wanayaibei, Cook Islands, Fiji	AB043669	Stiger <i>et al.</i> 2003
<i>S. furcatum</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. da Baleia, São Sebastião, SP, Brasil	Anexo 4.1	NI
<i>S. stenophyllum</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. Cibratel, Itanhaém, SP, Brasil	Anexo 4.1	NI
<i>S. vulgare</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. do Sul, Olivença, BA. Brasil	Anexo 4.1	NI
<i>S. cymosum</i> <i>var. cymosum</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. da Baleia, São Sebastião, SP, Brasil	Anexo 4.1	NI
<i>S. cymosum</i> <i>var. nanum</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. da Baleia, São Sebastião, SP, Brasil	Anexo 4.1	NI

Tabela 4.2: Táxons incluídos na matriz de alinhamento para as seqüências do marcador molecular plastídias *rbclS*. Grupo externo: *Turbinaria ornata*. NI corresponde a designação de não incluído.

Nome da espécie	Sub gênero	Coleção/Local	Genbank	Referência
<i>S. fallax</i>	<i>Arthrophyucus</i>	Victoria, Austrália	AF244333	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. palmeri</i>	<i>Phy/otrichia</i>	Ilha S.Clemente, CA, EUA	AF244339	Phillips <i>et al.</i> 2005
<i>S. thunbergii</i> (1)	<i>Bactrophyucus</i>	Shirahama, Japão	AF244332	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. muticum</i> (1)	<i>Bactrophyucus</i>	Qingdao, China	AF292068	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. baccularria</i>	<i>Sargassum</i>	Singapura	AY518392	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. myriocystum</i>	<i>Sargassum</i>	Ryukyu, Japão	AF244326	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. cristaeifolium</i>	<i>Sargassum</i>	Guam, Micronesia	AF244335	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. agardhianum</i>	<i>Sargassum</i>	Ilha Catalina, CA, EUA	AY256964	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. duplicatum</i>	<i>Sargassum</i>	Ryukyu, Japão	AF244325	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. sinicola</i>	<i>Sargassum</i>	Baja, México	AY518393	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. obtusifolium</i>	<i>Sargassum</i>	Oahu, HI	AF244328	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. polyphyllum</i> (1)	<i>Sargassum</i>	Lihue, Kaua'i, HI	AY518391	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. polyporum</i>	<i>Sargassum</i>	Ilha de Iriomote, Japão	AF244327	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. lapazeum</i>	<i>Sargassum</i>	Baja, México	AY256965	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. vulgare</i>	<i>Sargassum</i>	Arq. de San Blas, Panamá	AY590502	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. echinocarpum</i>	<i>Sargassum</i>	Oahu, HI	AF076689	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. muticum</i> (2)	<i>Bactrophyucus</i>	São Francisco, CA, EUA	AF244331	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. thunbergii</i> (2)	<i>Bactrophyucus</i>	Qingdao, China	AF244343	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. muticum</i> (3)	<i>Bactrophyucus</i>	Nova Zelândia	AJ287854	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. polyphyllum</i> (2)	<i>Sargassum</i>	Oahu, HI	AF076690	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>M. myagroides</i>	<i>Myagropsis</i>	Japão	AY246551	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>H. fusiformis</i>	<i>Bactrophyucus</i>	Japão	AY449537	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>T. ornata</i> (1)	<i>Turbinaria</i>	Honolulu, HI	AF076688	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>T. ornata</i> (2)	<i>Turbinaria</i>	Oahu, HI	AY518394	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>T. ornata</i> (3)	<i>Turbinaria</i>	Kona, HI	AY518395	Phillips <i>et al.</i> , 2005
<i>S. stenophyllum</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. Cibratel, Itanhaém, SP/ BR	Anexo 4.2	NI
<i>S. vulgare</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. do Sul, Olivença, BA/ BR	Anexo 4.2	NI
<i>S. filipendula</i>	<i>Sargassum</i>	Pr. da Fortaleza, Ubatuba, SP/ BR	Anexo 4.2	NI

III. RESULTADOS

A região espaçadora ITS2 com 483 pares de bases (pb), mais 56 pb do gene 5.8S foi completamente seqüenciada para as espécies *S. furcatum*, *S. stenophyllum*, *S. vulgare*, *S. cymosum* var. *cymosum* e *S. cymosum* var. *nanum* (Anexo 4.A). A comparação para esse marcador mostrou uma identidade de 100% entre os táxons.

A região espaçadora *rbclS* e parte do gene *rbcl* foram obtidas para as espécies *S. vulgare*, *S. filipendula* e *S. stenophyllum* (Anexo 4.B). A região espaçadora *rbclS* apresenta 163 pb e a parte do gene *rbcl* seqüenciada apresenta 474 pb, num total de 637 pb. A comparação para esse marcador mostrou uma identidade de 100% entre os táxons.

1 ITS2

As análises de uma matriz de ITS2 com 42 táxons e 651 posições através de diferentes métodos de inferência filogenética, neighbour joinning (NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verosimilhança (ML) resultou em árvores com topologias bastante semelhantes, nas quais se observam-se dois grandes grupos irmãos, com representantes pertencentes principalmente aos subgêneros *Bacthrophycus* (GI) e *Sargassum* (GII), sem indícios de qual seria mais derivado. A espécie *Turbinaria ornata* foi utilizada como grupo externo. As duas representantes da espécie *Miagropsis miagroides* formaram um ramo, com altos valores de “bootstrap” (100% NJ e MP), que, assim como a espécie *Sargassum boryii* (*Phyllothyria*), aparece na base do agrupamento monofilético com valores de “bootstrap” de moderado à alto (89% NJ; e 93% MP), que inclui todas as demais espécies (divididas nos dois grandes grupos, GI e GII).

O agrupamento (GI) que inclui 22 espécies do subgênero *Bacthrophycus* encontra-se com valores de “bootstrap” de moderado à alto (88% NJ; e 98% MP) e é composto por representantes de cada uma das seções (*Hizichia*, *Teretia*, *Spongiocarpus* e *Halochloa/Repentia*). A seção *Hizichia* é representada por duas seqüências de *H. fusiformis* (com valores máximos de “bootstrap” para ambos os métodos analisados). O agrupamento que inclui representantes da seção *Teretia* corresponde ao maior dos grupos formados, com 13 representantes, com valores de “bootstrap” de baixo à moderados (87% NJ e 55% MP). A seção *Spongiocarpus* representada três espécies apresenta valores máximos de “bootstrap” em ambos os métodos. O agrupamento constituído por duas seções, *Halochloa* e *Repentia* apresentou valores de “bootstrap” de moderado à alto (78% MP e 100% NJ). Este agrupamento tem um de seus terminais representando onze espécies distintas (Figura 4.1).

O segundo grande ramo constituído nestas análises (GII, com altos valores de “bootstrap” 100% NJ e 98% MP), representa predominantemente o subgênero *Sargassum*, porém com algumas exceções: a espécie *S. stolonnifolium* que não apresenta posição definida em nenhum subgênero; a presença de um representante do subgênero *Schizophycus*; e dois do subgênero *Phyllotrichia*. As espécies do Atlântico Sul seqüenciadas nesse trabalho se apresentam mais proximamente relacionadas à *S. sociale* e *S. alternatopinnatum*. (Figura 4.1).

Figura 4.1. Árvore de máxima parcimônia (MP) do ITS2 (651 posições). Inferida por busca heurística. Os valores de bootstrap, efetuados para 2000 replicatas, estão indicados: acima do ramos os valores de ML e abaixo: a) com fundo preto- os valores de máxima parcimônia (MP) e b) com fundo branco- os valores de neighbour-joining (NJ). As designações dos maiores grupamentos formados são: G1- grupo 1 e G2- grupo2. Para as árvores de NJ e MP foram feitas 1000 réplicas de “bootstrap”, mas para a árvore de ML, devido a restrições computacionais, não foi possível fazer essa análise. Os retângulos em destaque apresentam os táxons encontrado neste capítulo e em por Stiger et al. (2003), cujas seqüências apresentaram 100% de identidade em relação a respectiva espécie assinalada pela seta.

2. *rbcl* (parcial) e espaçador *rbclS*

As seqüências feitas neste estudo contém a porção final do *rbcl* (da posição 1 até o stop condon TAA, corresponde à 474 pares de bases) e a região do espaçador *rbclS* (da posição 475 à 637) com de 162 pares de bases. O alinhamento destas seqüências mostrou 100% de identidade entre as espécies *S. vulgare*, *S. filipendula* e *S. stenophyllum*. As análises de uma matriz de *rbclS* com 26 táxons e 618 posições através de diferentes métodos de inferência filogenética, resultou em árvores com topologias bastante semelhantes (Figura 4.2).

Figura 4.2. Árvore de distância por neighbour joining (NJ) dos *rbcl* e *rbclS* (618 posições). Inferida por modelo de substituição Tamura & Nei. Os valores de bootstrap, efetuados para 2000 replicatas, estão indicados: acima do ramos os valores de NJ e abaixo: a) os valores de máxima parcimônia (MP) e b) com moldura e fundo branco- os valores de máxima verossimilhança (ML.). Os subgêneros

estão designados com retângulos cinza escuro, exceto *S. sinicola*, destacando uma questão a ser revisada.

Utilizando como grupo externo três representantes da espécie *Turbinaria ornata*, o subgênero *Sargassum* apresentou-se polifilético, uma vez que *S. sinicola*, pertencente a esse subgênero, formou um grupo monofilético com *Myagropsis miagroides* com valores máximos de “bootstrap” em todos os métodos.

Outro grupamento monofilético, mas com valores de “bootstrap” relativamente baixos (75% NJ, 79% MP e 51% ML), inclui o subgênero *Sargassum* (exceto *S. sinicola*) como um grupo monofilético, mas com baixos valores de “bootstrap”; o subgênero *Bactrophycus*, que se apresentou de forma “fragmentada” como uma politomia; e *S. fallax* pertencente ao subgênero *Arthrophyucus*. O subgênero *Bactrophycus* foi representado por três grupos, dois deles compostos por ramos constituídos de representantes de uma mesma espécie: *S. muticum* com valores de “bootstrap” variando de baixo a alto (54%NJ; 100%MP e 97%ML); e outro por *S. thunbergii* com altos valores de “bootstrap” (97%NJ; 95%MP e 95%ML). Uma terceira terminação contida atualmente no subgênero *Bactrophycus* é o gênero *Hizikia* que corresponde atualmente a uma secção.

Dentro do ramo que com representantes do subgênero *Sargassum* pode-se observar a formação de diferentes grupos com valores variáveis de “bootstrap”, entre eles um ramo monofilético, sustentado por valores de “bootstrap” de moderados à altos (97%NJ; 88% MP e 90%ML), que inclui espécies do Atlântico Sul (*Sargassum* AS), *S. vulgare* (procedente do Panamá), dois representantes de *S. polyphyllum*, *S. polyporum*, *S. obtusifolium* e *S. palmeri* (do subgênero *Phyllotrichia*). Todos os representantes que pertencem ao subgênero *Sargassum*, estão contidos na secção Malacocarpicae, em duas tribos distintas tribo *Fruticuliferae* (*S. obtusifolium* e *S. polyporum*) e *Cymosae* (*S. vulgare* e *S. polyphyllum*). Foi avaliado para este ramo politômico o percentual de identidade de duas espécies em relação às de *Sargassum* AS e para efeito comparativo uma espécie de fora desta politomia e pertencente a outro subgênero. A comparação foi realizada com base em alinhamento de 650 pares de bases, obtendo-se os maiores valores de identidade para *S. obtusifolium* com 98,47% de identidade, *S. vulgare* (Panamá) com 98,16% e *S. fallax* (subgênero *Arthrophyucus*) com 95,56%. Um outro grupamento monofilético relacionado a este anterior (*S. baccularria*, *S. myriocystum* e *S. duplicatum*), também composto de representantes do subgênero *Sargassum* apresentou valores de “bootstrap” elevados (93%NJ; 94% MP e 97% MV). As espécies *S. agardhianum* e *S. lapazeum* formaram um ramo com baixo valor de “bootstrap” e apenas no método NJ.

IV. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste capítulo corroboram o que tem sido relatado na bibliografia referente ao gênero *Sargassum* e à ordem Fucales. Apesar de todos os indícios que fortalecem a hipótese de diferenciação genotípica entre variedades, como observa-se com aquelas incluídas neste estudo, *Sargassum cymosum* var. *cymosum* e *S. cymosum* var. *nanum*, não foram observadas diferenças na comparação entre as seqüências de ITS2 destas variedades. O mesmo pode-se dizer em relação aos resultados obtidos para dois marcadores plastidiais empregados neste capítulo (*rbcL/rbcLS*) entre as espécies *S. filipendula*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare* que freqüentemente, ocorrem em populações cuja gradação dos caracteres confere a designação de um “continuum” morfológico. A análise mais acertada para este resultado, deve ser que a obtenção de 100% de identidade intra-varietal e inter-específica deve-se a insuficiência de sinal filogenético dos marcadores escolhidos para este grupo, uma vez que tal conclusão não foge àquela mencionada em diversos trabalhos para o gênero *Fucus* citados por Serrão *et al.* (1999). O que se pode concluir é que outros marcadores moleculares devem ser testados em estudos eminentemente intra-populacionais no sentido de acrescentar informação genética à estudos de hibridação e ciclo de vida, incluindo os conhecimentos de fenologia, gametogênese e embriogênese das espécies.

A parte inicial das seqüências alinhadas nesta análise correspondem ao *rbcL* que de forma geral para os grupos de algas, e Phaeophyceae não foge a regra, trata-se de um marcador mais conservativo, principalmente se comparado com o espaçador *rbcLS*. Nas análises realizadas por Phillips *et al.* (2005), incluindo os métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança embasados por uma análise Bayesiana a topologia das árvores foi semelhante às nossas no que se refere à distinção entre os subgêneros. A exceção foi o subgênero *Bactrophycus* que nas análises deste estudo, possivelmente devido ao baixo sinal filogenético da matriz, não formou um agrupamento monofilético, mas sim uma politomia de pequenos ramos pertencentes à mesma secção (*Teretia*). Um destes ramos com três exemplares distintos de *S. muticum* e o outro com dois exemplares de *S. thunbergii*. Uma outra questão a ser observada, é que com o trabalho de Phillips *et al.* (2005) foi confirmada a inclusão de *Hizichia* como uma secção do subgênero *Bactrophycus*. A inclusão de *Hizichia* dentro do subgênero *Bactrophycus* já está bem estabelecida na literatura mesmo considerando outros marcadores como ITS2 (Stiger *et al.* 2003) e *psaA* (Cho *et al.* 2006).

A provável razão para que os resultados deste capítulo, referentes às análises com seqüências parciais de *rbcL* e *rbcLS* completas não apresentem-se tão resolutos quanto os encontrados por Phillips *et al.* (2005) deve-se ao fato destes autores empregarem uma matriz de dados maior, pois incluíram o *rbcL* completo juntamente com o espaçador *rbcLS*.

Neste estudo, foi enfatizada a busca por um marcador com maior grau de divergência, uma vez que os marcadores empregados não foram eficientes na separação das espécies brasileiras analisadas. Os espaçadores intergênicos ITS2 e *rbcLS* pareciam ser bons candidatos, uma vez que vêm sendo empregados tanto para o gênero *Sargassum*, como muitas vezes podem ser usados até como marcadores intra-específicos em alguns grupos (Milstein, 2006).

Objetivando encontrar um marcador que mostrasse alguma divergência entre os táxons incluídos neste estudo, foi priorizada a escolha daqueles que têm sido reportados na literatura. A princípio, foram empreendidas algumas tentativas (cinco táxons infragenéricos) com ITS2, extremamente utilizado nos táxons do Indo-Pacífico e correspondendo a maioria das seqüências do GenBank. Stiger *et al.* (2003) observaram uma distinção nas seqüências de ITS2 entre representantes da mesma espécie e, em contraposição discutem que onze táxons de morfologia acentuadamente distinta apresentaram 100% de identidade, assim como resultados encontrados neste capítulo.

Recentemente, alguns autores têm mencionado que as melhores perspectivas de encontrar um marcador molecular capaz de esclarecer as divergências existentes entre as espécies de *Sargassum* devem estar entre os genes plastidiais (Cho *et al.* 2006). Entretanto, algumas questões de maior detalhamento taxonômico pareceram ser mais bem esclarecidas através das análises em ITS2. As árvores geradas neste capítulo referentes às seqüências do gene *rbcL* e espaçador *rbcLS* não mostraram com clareza a separação das secções, tradicionalmente utilizadas desde o sistema de classificação de Agardh (1889). Até os dias atuais os principais critérios estabelecidos por Agardh (1889) ainda norteiam os taxonomistas especialistas neste gênero. Os subgêneros ainda são classificados em secções divididas em tribos baseadas principalmente nos caracteres reprodutivos, com ênfase na morfologia dos receptáculos. Destaca-se aqui, que tais critérios são acentuadamente variáveis, lembrando as diferenças dentro de uma mesma espécie em relação a regiões protegidas e expostas ao embate de ondas. Tal detalhamento em secção e tribo não foi evidenciado em árvores filogenéticas de *rbcL/rbcLS* mesmo considerando uma análise com seqüências completas de *rbcL* e do espaçador *rbcLS* como realizada por Phillips *et al.* 2005 e Phillips & Fredericq (2000). Neste capítulo podem-se destacar apenas alguns grupos isolados em que se observou relação destes com as secções e tribos, porém não representam o que se observa com maior freqüência. Observando os resultados obtidos neste capítulo, encontram-se alguns exemplos, como o das espécies *S. agardhianum* e *S. lapazeum* apresentaram baixos valores de “bootstrap” apesar de considerados da mesma secção *Zygocarpicae* e tribo *Holozigocarpicae*. Por outro lado, a topologia das árvores geradas a partir do ITS2 evidenciaram melhor estas distinções que na sua ampla maioria refletem variações morfológicas nos ramos

reprodutivos, principalmente no subgênero *Bactrophycus*. Para afirmar melhor o mesmo para o subgênero *Sargassum*, seria interessante que as matrizes de ITS2 apresentarem um número maior de representantes. Stiger *et al.* (2003) com ITS2 constataram uma forte correlação entre os seus resultados obtidos e o sistema de classificação que inclui secções e tribos.

Dentre os resultados encontrados neste capítulo, destaca-se que, contrariamente ao sistema clássico desenvolvido por J. Agardh (1889), observou-se que o subgênero *Phyllotrichia* não é monofilético e tão pouco suas espécies são ancestrais em relação ao subgênero *Sargassum*. Este resultado corrobora aquele encontrado por Phillips *et al.* (2005). No que se refere aos demais subgêneros, pouco podemos afirmar sobre o *Arthrophyucus*, pois este está representado por uma única espécie (*S. fallax*), que agrupa-se em uma politomia que também inclui *Sargassum* e *Bactrophycus*. O subgênero *Sargassum* forma um grupamento que, após somente a consolidação da espécie *S. sinicola* fora do subgênero *Sargassum* como sugerem alguns autores, poderá ser considerado monofilético.

A nossa escolha do grupo externo foi ponderada de acordo com Phillips *et al.* (2005), apesar de Stiger *et al.* (2000) terem escolhido *Myagropsis miagroides* como grupo externo de suas análises com ITS2. subgênero *Sargassum* apresentou-se parafilético nos resultados com *rbcL* (parcial) e o espaçador *rbcLS*. O gênero *Myagropsis*, representado por uma única espécie, *Myagropsis miagroides* deve ser em breve revisado, pois anteriormente pertencia à família Cystoseiraceae (Jensen 1974).

Alguns estudos ainda aceitam e mantém a família Cystoseiraceae e questionam que deve permanecer separada (Saunders & Kraft 1985), entretanto, outros consideram família Sargassaceae (*senso lato*) como incluindo todos os representantes de ambas as famílias (Cho *et al.* 2006). Este último critério reflete uma tendência atual e aquele que adotamos neste estudo.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARDH, J. G. 1889 Species Sargassorum Australiae. Kgl. Svenska Vetenska Akad. *Handl.* 23 (3): 1- 133, pl. 1- 31.
- 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.
- CHO, G. Y.; F. ROUSSEAU; B. DE REVIERS; S.M. BOO 2006. Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding *psaA* sequences. *Phycologia*, 45 (5): 512-519.

- FUJIWARA J.; H. IWAHASHI; J. SOMEYA; S. NISHIKAWA. 1993. Structure and cotranscription of the plastid-encoded *rbcL* and *rbcS* genes of *Pleurochrysis carterae* (Prymnesiophyta). *Journal of Phycology* 29:347-355.
- GOFF L. J., D. A. MOON, A.W. COLEMAN 1994. Molecular delineation of species and species relationship in the red algae agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariiales). *Journal of Phycology* 30: 521-537.
- HO, C.; S. PHANG; T. PANG . 1995a Molecular characterisation of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. *Journal of Applied Phycology*, 7: 33- 41.
- HO, C.; S. PHANG; T. PANG . 1995b. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selection *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales). *Eur. J. Phycol.* 30: 273- 280.
- JENSEN, J. B. 1974. Morphological studies in *Cystoseiraceae* and *Sargassaceae* (Phaeophyta), with special reference to apical organization. Univ. Calif. Publis. Bot. 68: 1-61.
- LIM B.L.; HORI H., OSAWA S. 1983. The nucleotide sequences of 5S rRNAs from a multicellular green alga, *Ulva pertusa*, and two brown algae, *Eisenia bicyclis* and *Sargassum fulvellum*. *Nucleic Acids Res.* 11(6): 1909-1912.
- MAGGS C. A.; S. E. DOUGLAS; J. FENETY; C. J. BIRD 1992. A molecular and morfological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of Phycology* 28: 1214-232.
- MILSTEIN D. 2006. Diversidade Molecular das espécies de *Porphyra* do Brasil. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, USP. São Paulo 120p.
- PHILLIPS, N. & S. FREDERICQ, 2000. Biogeographic and phylogenetic investigations of the pan-pacific genus *Sargassum* with respect to Gulf of Mexico species. *Gulf. Mex. Sci.* , 18: 77- 87.
- PHILLIPS, N.; C. M. SMITH & C. W. MORDEN 2005. Testing systematic concepts of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) using portions of *rbcLS* operon. *Phycological Research*, 53: 1-10.
- SERRÃO E. A.; L. A. ALICE; S. H. BRAWLEY 1999. Evolution of *Fucaceae* (Phaeophyceae) inferred from nrDNA-ITS. *Journal of Phycology* 35: 382-394.
- STIGER V.; T. Horiguchi; T. YOSHIDA; A. W. COLEMAN; M. MASUDA 2000. Phylogenetic relationship of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section *Phyllocystae* based on ITS 2 nrDNA sequences. *Phycological Research*, 48: 251-260.
- STIGER, V; Horiguchi, T, YOSHIDA, T.; COLEMAN, A. W. E MASUDA, M.. 2003. Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae),inferred from

ITS-2 nrDNA, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus. *Phycological Research*, 51: 1-10.

YOSHIDA, T. 1983 Japanese species of *Sargassum* subgenus *Bactrophyucus* (Phaeophyta, Fucales). *J. Fac. Sci. Hokaido. Univ. Series V (Bot.)* 13: 9-246.

YOSHIDA, T., V. STIGER, T. HORIGUCHI. 2000. *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan *Phycol. Res.*, 48, pp. 125-132

ZUCARELLO, G. C. & J. A. WEST 1997. Hybridisation 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.

Alinhamento de seqüência Anexo 4.A

Alinhamento das seqüências completas de ITS2 (estrutura primária) dos táxons infragenéricos: *Sargassum vulgare*, *S. furcatum*, *S. cymosum* var. *cymosum* (Scym *cymosum*), *S. cymosum* var. *nanum* (Scym *nanum*) e *S. stenophyllum*. As posições idênticas foram identificadas por pontos. Os números acima dos nucleotídeos representam a posição neste alinhamento. Os primers das pontas 5´ e 3´ foram trimados das seqüências. Os 56 primeiros nucleotídeos da seqüência correspondem à região 5.8S. O início da seqüência do ITS2 está assinalada com hífen separando-o da região do 5.8S. Os primers “forward/reverse” estão registrados na Tabela 2.4 do capítulo 2.

	10	20	30	40	50	60	70
Svulgare	ACGCATCTTGCGCTCCCGGGATATGCCTGGGAGCATGCTTGTCGGGGAGGAGGAGG	CGAAAAC	TCGCCC				
Sfurcatum						-	
Scym nanum						-	
Scym cymosum						-	
Sstenophyllum						-	
	80	90	100	110	120	130	14
Svulgare	ACAGCTTTGGGTT	CGATCTCGACCTCAAGGCGGTGGAGCGGAATCTGAGTGTTCCGGGGAGCGGTAGTGT					
Sfurcatum							
Scym nanum							
Scym cymosum							
Sstenophyllum							
	150	160	170	180	190	200	21
Svulgare	GGTG	TGATTTCTGTACATACTGCTGTTGTCCTCCCTGAGTCCACCCAAACCTAGAGAGCTACCGATTGT					
Sfurcatum							
Scym nanum							
Scym cymosum							
Sstenophyllum							
	220	230	240	250	260	270	28
Svulgare	CCGGACTTCTATTGTC	TTTGGGCGCTGGAGACAGGTCTACCTGCGTCCCTCCGGAAGATGCGTTGTTGA					
Sfurcatum							
Scym nanum							
Scym cymosum							
Sstenophyllum							
	290	300	310	320	330	340	35
Svulgare	CCTCACCCCTCTCGCGGGGCGGGGACACCCGACAAGTCGCCGGGGATGTGGGCGGGTGACCTTGAGGCGT						
Sfurcatum							
Scym nanum							
Scym cymosum							
Sstenophyllum							
	360	370	380	390	400	410	42
Svulgare	CGCTGGAGGCAAGTTCACCTTGCGTCCTCCGGAGGATCCGTTGTTGACGGCGCCCATATCACGGGGCGG						
Sfurcatum							
Scym nanum							
Scym cymosum							
Sstenophyllum							
	430	440	450	460	470	480	49
Svulgare	GGACACGACGGGTCGCCGGGGATGTGCGCGGGTGGTCTTGAGGCTTGGGACGGTAGGCAGTCTCGAGAGT						
Sfurcatum							
Scym nanum							
Scym cymosum							
Sstenophyllum							
	500	510	520	530			
Svulgare	GCCGGTGAGAGGCCGGTAATTATGATTATGCCATACCCCGATCAAGCA						
Sfurcatum							
Scym nanum							
Scym cymosum							

Alinhamento de seqüência

Anexo 4.B

Alinhamento das seqüências de *rbcL* (parcial) e do espaçador *rbcLS* (completo) das espécies: *Sargassum vulgare*, *S. filipendula* e *S. stenophyllum*. As posições idênticas foram identificadas por pontos. Os números acima dos nucleotídeos representam a posição neste alinhamento. Os primers das pontas 5´ e 3´ encontram-se destacados com letra minúscula e na Tabela 2.4 capítulo 2

Considerações Finais

- ✚ Foram realizadas as primeiras inferências filogenéticas incluindo representantes da ordem Fucales para o Atlântico Sul;
- ✚ Foram seqüenciados os marcadores nucleares SSU rDNA completo (1787 pb) e o ITS2 (539 pb) para 5 táxons infra-genéricos do Atlântico Sul para o gênero *Sargassum*. Os alinhamentos resultantes de ambos os marcadores ITS2 e SSU rDNA apresentaram 100% de identidade para os táxons infragenéricos de *S. cymosum* var. *cymosum* e *S. cymosum* var. *nanum*, *S. furcatum*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare*.
- ✚ Foi seqüenciado o marcador plastidial *rbcLS* (637 pb) para 3 táxons infra-genéricos do Atlântico Sul para o gênero *Sargassum*. Os alinhamentos resultantes de seqüências plastidiais, *rbcL* (parcial) e *rbcLS* (completo) apresentaram 100% de identidade para as espécies *S. filipendula*, *S. stenophyllum* e *S. vulgare*.
- ✚ Os resultados obtidos para os três marcadores moleculares utilizados para as espécies de *Sargassum* do Atlântico Sul, indicam que essas espécies ou se divergiram muito recentemente ou ainda estão em processo de divergência. A questão da manutenção dessas espécies como entidades separadas, passa por um amplo estudo populacional, levando em conta aspectos ecológicos e biogeográficos, e pela busca de um marcador mais variável que possa indicar as relações entre essas entidades de maneira mais eficiente.
- ✚ As inferências filogenéticas geradas da comparação de seqüências de SSU rDNA das espécies produzidas neste estudo em relação àquelas já disponíveis no GenBank corroboram as últimas alterações realizadas para a família Sargassaceae em relação demais na Ordem Fucales;

- ✚ As inferências filogenéticas produzidas pela comparação de seqüências de ITS2 fortalecem a eficiência do sistema de segregação dos subgêneros *Phyllotrichia*, *Schizophycus*, *Bactrophycus*, *Arthrophycus* e *Sargassum*, apontado poucas alterações em relação aquele elaborado com base em critérios morfológicos por J. Agardh (1889).
- ✚ A segregação de secções, baseada principalmente em aspectos da morfologia das estruturas reprodutivas, parece melhor aceito se consideradas as análises com ITS2. O gene plastidial *rbcL* e o espaçador *rbcLS* não apresenta em suas árvores grupamentos monofiléticos compostos de representantes de cada secção, principalmente se considerarmos os representantes do subgênero *Sargassum*.
- ✚ O posicionamento das espécies do Atlântico Sul nas árvores filogenéticas corrobora com a inserção destas espécies dentro do subgênero *Sargassum*, Estas se encontram mais proximamente relacionadas às espécies do Indo-Pacífico do que com as espécies do Atlântico Norte reforçando a hipótese biogeográfica da região do Indo Pacífico como centro dispersor para este gênero.