Adriana Vieira de Castro Martins

**Caracterização molecular e morfológica de
isolados brasileiros do gênero *Euglena***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Biologia da Relação Patógeno- Hospedeiro

Orientadora:
Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira

**São Paulo
2008**

RESUMO

Martins AVC. Caracterização molecular e morfológica de isolados brasileiros do gênero *Euglena* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Os membros do gênero *Euglena* formam um grupo heterogêneo de flagelados unicelulares abundantes no solo e na água, posicionados na classe Euglenoidea do filo Euglenozoa, junto às classes Kinetoplastea e Diplonemea. Apesar de avanços recentes, o relacionamento filogenético de flagelados do gênero *Euglena* está longe de ser entendido, e as relações filogenéticas entre as espécies variam de acordo com o conjunto de taxa, genes e metodologias filogenéticas empregadas. Para avaliar a real diversidade e melhor resolver o relacionamento de espécies classificadas no gênero *Euglena*, é necessário analisar um maior número de isolados provenientes de diversos habitats, com origens geográficas mais abrangentes. Neste estudo foram isolados, cultivados e caracterizados flagelados de 20 amostras de solo e água dos biomas brasileiros da Mata Atlântica, Pantanal, Amazônia e Cerrado. Os isolados foram classificados no gênero *Euglena* com base em parâmetros taxonômicos morfológicos tradicionais, microscopia de luz, que permitiu distribuir isolados em 5 grupos de acordo com forma e mobilidade da célula e presença ou ausência de cloroplastos e flagelo. Todas as culturas foram caracterizadas por comparação de seqüências do gene SSU rDNA, e de 20 culturas foram obtidas 25 seqüências, indicando a presença de 5 culturas mistas contendo dois isolados. Análises filogenéticas do gene SSU rDNA foram realizadas a fim de avaliar a diversidade genética e inferir relações filogenéticas entre isolados brasileiros e espécies de *Euglena* da Europa, América do Norte e Ásia. As árvores geradas com os métodos de ML e Bays posicionaram os novos isolados do gênero *Euglena* nos grupos A1, A2 e A3, previamente definidos em estudos baseados em genes ribossômicos nucleares (18S e 24S) e do cloroplasto (16S e 23S). Essas análises corroboraram a classificação de todos os isolados brasileiros no gênero *Euglena* e distribuíram 24 seqüências no grupo A3 e uma no grupo A2. Nenhum isolado brasileiro foi posicionado no grupo A1. Embora os isolados tenham se posicionado no grupo A3, que segregou os isolados brasileiros em 7 clados nas análises bayesianas e ML, o relacionamento entre os subclados do grupo A3 foram diferentes de acordo com o método utilizado e foram pouco suportados nas análises por ML. Para melhor resolver as relações filogenéticas entre os isolados do grupo A3, foi utilizado um alinhamento da SSU rDNA restrito a este grupo, que geraram árvores congruentes e subclados bem suportados independentemente da metodologia utilizada (ML ou

Bayesiana). Todas as análises confirmaram o posicionamento dos isolados Brasileiros no grupo A3, distribuídos em 6 clados formados exclusivamente por isolados brasileiros, exceto *E. intermedia* da China posicionado em um clado com três isolados brasileiros. Isolados representativos de cada espécie definida nas inferências filogenéticas foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. As imagens obtidas revelaram dois padrões principais de estrias e poros da película compartilhados por isolados de clados distintos. Apenas os isolados do clado Braziliensis exibiram um padrão particular das espirais de redução das estrias. Assim, as análises filogenéticas revelaram uma diversidade maior do que aquela encontrada por análise de microscopia de luz. As árvores filogenéticas inferidas neste estudo acrescentaram diversas seqüências no grupo A3, o que resultou em um melhor entendimento da diversidade genética e dos relacionamentos entre os isolados desse grupo. Este estudo corroborou a grande complexidade do gênero *Euglena*, revelando novos subclados e permitindo a identificação de 6 novas espécies de *Euglena* no grupo A3. Os isolados caracterizados neste estudo são os primeiros do Brasil estabelecidos em cultura, validados por análises filogenéticas e morfollogicamente caracterizados por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-chave: *Euglena*; Filogenia e Evolução; Taxonomia; SSU rDNA; Morfologia; Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

Martins AVC. Molecular and morphological characterization of Brazilian isolates of the genus *Euglena* [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

The genus *Euglena* is a heterogeneous group of unicellular flagellates abundant in soil, freshwater and marine environments, positioned within the class Euglenoidea of the phylum Euglenozoa, together with the classes Kinetoplastea and Diplonemea. Despite recent improvements, the phylogenetic relationships within the genus *Euglena* are far from understood, with relationships between species varying according to taxa, genes and phylogenetic methodologies. For a real appraisal of the diversity and better resolution of relationships within *Euglena* it is necessary to analyse a bigger amount of isolates from a range of habitats and geographical origins. In this study, we isolated in culture and characterized flagellates from 20 samples of soil and water of the Brazilian biomes of the Atlantic Forest, the Pantanal, Amazonia and Cerrado. The isolates from the 20 established cultures were classified as *Euglena* by traditional taxonomic parameters through light morphology, which allowed the distribution of isolates in 5 main morphological groups according to cell shape and motility, and presence or absence of chloroplasts and flagellum length. These cultures were all characterized by sequencing analysis of whole SSU rDNA, and from 20 cultures it was obtained 25 different sequences, indicating the existence of 5 mixed cultures containing two highly distinct isolates. Phylogenetic analyses using SSU rDNA were carried out to evaluate the genetic diversity, and to infer phylogenetic relationships between Brazilian isolates and *Euglena* spp. from Europe, North America and Asia. Trees generated by ML and Bayesian analyses divided the genus *Euglena* in groups A1, A2 and A3, as previously defined in studies based on nuclear (18S and 24S) and chloroplast (16S and 23S) genes. Both phylogenetic analyses corroborated the classification of all Brazilian isolates as members of the genus *Euglena* and positioned 24 sequences in group A3, one sequence in group A2, while no Brazilian isolate was positioned within group A1. Although the clustering of isolates within group A3 as well as the segregation of Brazilian isolates in 7 clades were congruent in both ML and Bayesian analyses, the relationships among the subclades of A3 differed according to the methods used, and were weakly supported in ML analysis. To better resolve the relationships between isolates of group A3, an alignment restricted to SSU rDNA sequences of this group was used, generating congruent ML and Bayesian trees and subclades well supported in both analyses. All

analyses corroborated the distribution of Brazilian isolates in 6 clades formed exclusively by isolates from Brazil. Exception was only *E. intermedia* from China that clustered with three Brazilian isolates. Isolates representative of each species were analysed through scanning electron microscopy and revealed two major patterns of pellicle strip and pore patterns shared by isolates positioned in different clades. Only the isolates of clade Braziliensis exhibited a peculiar pattern of strip reduction. Therefore, molecular phylogenetic analyses revealed a larger diversity than disclosed by light morphological analysis. The phylogenetic trees inferred in this study greatly improved the taxa sample from previous studies providing a better understanding of the genetic diversity and relationships among clades within the genus *Euglena*. This study corroborated the high complexity of this genus, disclosing new subclades, and enabling the identification of 6 new species of *Euglena* nested in group A3. Isolates characterized in this study are the first in Brazil to be described, established in culture, validated by phylogenetic analyses and morphologically characterized by light and scanning electron microscopy.

Key words: *Euglena*; Phylogeny and Evolution; Taxonomy; SSU rDNA; Morphology; Scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Filo Euglenozoa

O filo Euglenozoa é composto por um grupo diverso de eucariotos unicelulares que apresentam uma grande variedade de estilos de vida, incluindo organismos de vida livre fototróficos, osmotróficos ou fagotróficos, além de parasitas facultativos ou obrigatórios de plantas, invertebrados e vertebrados. O filo Euglenozoa foi subdividido com base em parâmetros morfológicos no subfilo Plicostoma, que engloba os diplonemídeos e euglenídeos, e no subfilo Saccostoma, que engloba os cinetoplastídeos (Cavalier-Smith, 1981; Moreira *et al.*, 2001; Busse e Preisfeld, 2002, 2003; Adl *et al.*, 2005). Os membros deste grupo são unidos por características morfológicas singulares, como a presença de uma película, ausência de parede celular, uma mitocôndria com cristas discóides e presença de um ou dois flagelos emergentes na região anterior da célula com mastigonemas não tubulares (Cavalier-Smith, 1981). As espécies fototróficas possuem cloroplastos envoltos por três membranas e produzem clorofila A e B (Cavalier-Smith, 1981; 1999). Com o avanço do conhecimento sobre os organismos do filo Euglenozoa, especialmente das espécies de vida livre, e com base em informações geradas em análises filogenéticas moleculares, os organismos do filo Euglenozoa foram reclassificados em três classes: Kinetoplastea, Diplonemea e Euglenoidea (Moreira *et al.*, 2001; Busse e Preisfeld, 2002, 2003; Adl *et al.*, 2005).

A classe Kinetoplastea, que compreende as subordens Trypanosomatina e Bodonina, se caracteriza pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria constituída por moléculas de DNA circulares concatenadas (Vickerman, 1976). Os tripanossomatídeos apresentam um único flagelo e são parasitas obrigatórios de invertebrados, plantas e de todas as ordens de vertebrados, com uma grande distribuição geográfica. Quando patogênicos, estes organismos são responsáveis por doenças de grande importância médica humana e veterinária, como a doença de Chagas, a Tripanossomíase Africana e as leishmanioses. Os bodonídeos são organismos biflagelados que apresentam diferentes estilos de vida, com espécies de vida livre e importantes parasitas de peixes (*Bodo*, *Cryptobia* e *Trypanoplasma*). As espécies de vida livre são abundantes na natureza, presentes tanto no solo como em água doce e salgada, e desempenham um papel importante no controle de bactérias, além de servirem como fonte de alimento para alguns invertebrados (Vickerman, 1976).

A classe Diplonemea (diplonemídeos) é formada por organismos biflagelados heterotróficos divididos nos gêneros *Diplonema* e *Rhynchopus*, que compreendem organismos de vida livre geralmente encontrados em sedimentos do fundo do mar. Os

diplonemídeos não possuem cloroplasto, cinetoplasto, ou mastigonema. Estes organismos são considerados fagotróficos ou, ocasionalmente, parasitas facultativos de crustáceos (Kent *et al.*, 1987; Simpson e Roger, 2004; Von der Heyden *et al.*, 2004).

A classe Euglenoidea (euglenídeos) compreende organismos de vida livre encontrados de forma abundante no solo e em água-doce, com algumas espécies encontradas em água do mar (Hollande, 1952; Pringsheim, 1953; Esson e Leander, 2008). Os euglenídeos estão divididos em seis ordens de acordo com parâmetros morfológicos e fisiológicos: Euglenales, Eutreptiales, Rhabdomonadales, Sphenomonadales, Euglenamorphales e Heteronematales (Leedale, 1967). A monofília desses grupos, assim como os gêneros que constituem essas ordens tem sido bastante discutida e revista com base em estudos moleculares (Preisfeld *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2003; Milanowski *et al.*, 2001, 2006).

1.2 Filogenia e Evolução do Filo Euglenozoa

O posicionamento do filo Euglenozoa na árvore filogenética universal permanece controverso, embora estudos morfológicos e moleculares recentes posicionem o filo junto ao infra-reino Excavata, em conjunto com os filou Louksozoa, Percolozoa e Metamonada (Cavalier-Smith, 2002, 2003; Simpson, 2003; Keeling *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2007). Inicialmente, os Excavata foram definidos com base em características morfológicas do canal de alimentação ventral por onde passam um ou mais flagelos (Cavalier-Smith, 2002). No entanto, estudos baseados em análises moleculares posicionaram organismos que não apresentavam este aparato morfológico junto aos Excavata, sugerindo que esta característica tenha sido perdida (Cavalier-Smith, 2002; Simpson, 2003). Este fato é exemplificado pelos membros do filo Euglenozoa, que não possuem nenhuma das apomorfias dos membros do infra-reino Excavata, mas são fortemente posicionados neste grupo por filogenias moleculares (Simpson, 2003; Simpson e Roger, 2004).

Inicialmente, os filou Euglenozoa e Percolozoa foram incluídos no superfilo Discicriscata com base em características morfológicas da mitocôndria e dados moleculares (Cavalier-Smith, 2002; Baldauf, 2003; Keeling *et al.*, 2005). Entretanto, estudos moleculares recentes indicaram que membros da classe Jakobea (filou Louksozoa) se posicionam junto aos Discicriscata, apesar de não partilharem características morfológicas da mitocôndria (Cavalier-Smith, 2003; 2004; Simpson *et al.*, 2006). Deste modo, além de existirem controvérsias quanto à monofilia dos Excavata (Cavalier-Smith, 2003, 2004; Baldauf, 2003; Simpson e Roger, 2004; Adl *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2008),

alguns estudos não reconhecem os Discicriscatas como uma divisão natural do grupo (Simpson, 2003, 2006).

O relacionamento do grupo Excavata em relação aos demais eucariotos também tem gerado divergências. Análises baseadas em seqüências do gene ribossômico posicionaram organismos do grupo Excavata sem mitocôndria entre os primeiros eucariotos a divergir, logo após a separação da linhagem procariótica, sugerindo que tenham evoluído antes da origem da mitocôndria (Baldauf, 2003). No entanto, estudos posteriores indicaram a existência de organismos ancestrais deste grupo com mitocôndria, sugerindo que as análises filogenéticas teriam gerado artefatos devido ao processo de atração de ramos longos (Cavalier-Smith, 2003, 2004).

O relacionamento evolutivo entre as classes Diplonemea, Kinetoplastea e Euglenoidea, que formam o filo Euglenozoa, tem sido bastante discutido. Estudos morfológicos sugeriram que euglenídeos e diplomemídeos seriam taxa irmãos, sendo agrupados no subfilo Plicostoma, enquanto os cinetoplastídeos foram segregados no subfilo Saccostoma (Cavalier-Smith, 1995). No entanto, estudos moleculares baseados em seqüências do gene ribossômico (SSU rDNA) e dos genes que codificam as proteínas Hsp90 e Hsp70, indicaram uma relação mais próxima dos cinetoplastídeos com os diplomemídeos do que com os euglenídeos, que foram posicionados como grupo mais ancestral (Fig.1) (Maslov *et al.*, 1999; Sturm *et al.*, 2001; Simpson e Roger, 2004). Além disso, as relações filogenéticas entre os gêneros que compõem as classes Kinetoplastea, Diplonemea e Euglenoidea também permanecem incertas.

A história evolutiva dos cinetoplastídeos continua pouco resolvida (Maslov *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2000; Lukes *et al.*, 2002), embora diversos estudos filogenéticos tenham sido realizados, principalmente com base em seqüências do gene ribossômico (SSU rDNA) (Lukes *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1999; Atkins *et al.*, 2000; Dolezel *et al.*, 2000). Análises da SSU rDNA usando um grande número de representantes e diferentes métodos de inferências filogenéticas têm ajudado a resolver algumas questões como, por exemplo, o relacionamento entre os tripanossomatídeos (Lukes *et al.*, 1997; Hollar *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 1999; Merzlyak *et al.*, 2001) e a polifilia dos principais grupos de bodonídeos, *Bodo* e *Cryptobia* (Dolezel *et al.*, 2000; Callahan *et al.*, 2002; Hughes e Piontkivska 2003a; Moreira *et al.*, 2004).

Os diplomemídeos têm despertado muita atenção devido a algumas peculiaridades estruturais da mitocôndria e um mecanismo característico de edição dos genes mitocondriais (Marande *et al.*, 2005; Marande e Burger, 2007). A classe Diplonemea apresenta, até o momento, apenas dois gêneros com espécies cultivadas (*Diplonema* e

Figura 1. Árvore filogenética baseada na análise combinada das proteínas Hsp90 e Hsp70, construída pelo método de Máxima Verossimilhança (MV). Os números superiores correspondem aos valores de suporte por “bootstrap” por MV, e os números inferiores correspondem aos valores de suporte de MV de distância (MVdist). Valores <25% foram omitidos. A caixa corresponde ao suporte para o clado cinetoplastídeos-diplonemídeos (K, D).
FONTE: Modificado de Simpson e Roger, 2004.

Rhynchopus). Além destes diplonemídeos, existem seqüências de DNA de organismos não cultivados que se posicionam em filogenias do gene SSU rDNA como um grupo irmão, embora muito distante, do gênero *Diplonema* e *Rhynchopus*. Estes estudos incluem seqüências de organismos de amostras de água hidrotermais (900 m) e de plâncton (3000 m) do fundo do mar (López-García *et al.*, 2001; 2007). Estudos recentes aumentaram consideravelmente o conhecimento da diversidade dos diplonemídeos, revelando a existência de dois novos clados com diferentes filotipos (Lara *et al.*, 2008) amplamente distribuídos no plâncton do fundo do mar e que exibem uma estratificação nas colunas de água, como já observado para outros organismos do filo Euglenozoa (Countway *et al.*, 2007).

Durante muitos anos, os euglenídeos foram classificados como microalgas devido à presença de cloroplastos nos organismos da ordem Euglenales (euglenídeos). No entanto, a maioria dos membros da classe Euglenoidea não apresenta coloração e exibem estilos de vida fagotróficos e osmotróficos. Quando fototróficos, os euglenídeos apresentam cloroplastos com clorofila A e B nas membranas tilacóides. Esta é a principal

característica que levou à associação desses organismos com a classe Clorophyceae ou “algas-verdes”. Atualmente, esta relação ainda é considerada na literatura, embora a única semelhança entre os dois grupos (euglenídeos autotróficos e algas verdes), tanto fisiológica quanto estrutural, seja a similaridade dos cloroplastos.

Em 1981, Gibbs sugeriu que os euglenídeos adquiriram os seus cloroplastos por endossimbiose secundária ao fagocitar uma alga verde, explicando assim a similaridade de seus cloroplastos. Estudos moleculares reforçaram esta hipótese ao mostrar, por análises de SSU rDNA, que os euglenídeos são filogeneticamente mais relacionados aos tripanossomatídeos do que às algas verdes (Sogin *et al.*, 1986). Recentemente, foram encontrados genes similares aos de planta (genes “plant-like”) em cinetoplastídeos que não possuem cloroplastos, sugerindo que a endossimbiose secundária de cloroplastos neste grupo ocorreu num ancestral comum aos euglenídeos e cinetoplastídeos (Hannaert *et al.*, 2003). No entanto, análises filogenéticas sugerem que a origem da fototrofia ocorreu em um ancestral da ordem Euglenales, composta por euglenídeos fotossintéticos (Montegut-Felkner e Triemer, 1997; Preisfeld *et al.*, 2000; Müllner *et al.*, 2001). Além disso, estudos moleculares e comparações ultra-estruturais da película sugeriram que os euglenídeos fototróficos evoluíram de organismos fagotróficos (Montegut-Felkner e Triemer, 1997; Leander, 2004). Assim, é atualmente sugerido que a endossimbiose secundária que deu origem aos cloroplastos dos Euglenales é um evento recente (Nozaki *et al.*, 2003b; Leander, 2004), enquanto os genes “plant-like” encontrados nos cinetoplastídeos provavelmente resultam de uma endossimbiose primária ancestral (Nozaki *et al.*, 2003a; Nozaki, 2005).

Com base em análises moleculares do gene ribossômico acredita-se que após a aquisição dos cloroplastos houve uma redução na pressão seletiva para manter a metabolia da célula (movimento euglenóide), dando origem aos táxons fotossintéticos rígidos (Nudelman *et al.*, 2003). O posicionamento de espécies osmotróficas junto a espécies fotossintéticas sugere que a osmotrofia tenha surgido múltiplas vezes nos euglenídeos (Linton *et al.*, 1999; Müllner *et al.*, 2001; Nudelman *et al.*, 2003).

O gênero *Euglena* foi, até recentemente, considerado polifilético. No entanto, filogenias baseadas no gene ribossômico (SSU rDNA e LSU rDNA) resultaram na transferência de algumas espécies rígidas de *Euglena* para o gênero *Lepocinclis* (Marin *et al.*, 2003), assim como na criação de um novo gênero, *Discoplastis*, para acomodar espécies não rígidas de *Euglena* (Triemer *et al.*, 2006) restabelecendo a monofília do gênero *Euglena*.

1.3 Taxonomia de Euglenídeos

1.3.1 Classe Euglenoidea

A classe Euglenoidea é extremamente diversa, contendo espécies fototróficas, fagotróficas e osmotróficas. Tradicionalmente, os estudos taxonômicos são baseados exclusivamente em características morfológicas, o que gerou inúmeras discussões em relação às características utilizadas como parâmetros de classificação desta classe. Assim, devido à presença de cloroplastos em alguns gêneros, alguns pesquisadores consideram os euglenídeos algas, enquanto outros os consideram protozoários. Entretanto, nenhum estudo filogenético apóia a inclusão destes organismos no grupo das algas.

A sistemática dos euglenídeos tem sido revista à quase dois séculos, com inúmeros trabalhos que visavam organizar a taxonomia destes organismos (Triemer e Farmer, 2007). Inicialmente, foram sugeridos quatro grupos principais distinguíveis principalmente pela presença (formas pigmentadas) ou ausência (formas não pigmentadas) de cloroplastos e, conseqüentemente, pelo modo de nutrição. Com base em características morfológicas, as formas pigmentadas e não pigmentadas foram consideradas como um único grupo, diminuindo o peso taxonômico dos cloroplastos. No entanto, estudos posteriores seguiram os parâmetros de presença ou ausência de pigmentação voltando a ter uma grande importância taxonômica (Triemer e Farmer, 2007). Em 1928, Reichenow sugeriu que as formas sem pigmentação (Astasiidae) e pigmentadas (Euglenidae) fossem unidas em um único grupo distinto das formas fagotróficas (Peranemidae). Porém, essa proposta foi criticada por protozoologistas da época que consideravam os euglenídeos pigmentados como membros do reino Plantae, enquanto as formas sem pigmento eram consideradas animais (Triemer e Farmer, 2007). Desde esse período, existem controvérsias entre botânicos e protozoologistas em relação à sistemática de euglenídeos.

A utilização de características morfológicas (forma da célula, simetria, estrutura flagelar) associadas a características fisiológicas (modo de nutrição, metabolia) resultou na criação de três grupos: Peranemoides, Petalomonadinees e Euglenoidinees (Hollander, 1942, 1952). A este sistema de classificação foram incorporadas novas informações fisiológicas e estruturais, tais como: número, morfologia e inserção do flagelo; presença de estigma independente de cloroplastos; simetria da célula;

características da película e condensação dos cromossomos durante o ciclo celular (Leedale, 1967).

Hipóteses de que euglenídeos fagotróficos teriam adquirido cloroplastos por endossimbiose secundária de uma alga verde (Leedale, 1978; Gibbs, 1978, 1981) levaram a modificações taxonômicas. Assim, a classe Euglenoidea foi dividida nas ordens Euglenales, Eutreptiales e Euglenamorphales, com organismos fotossintéticos e alguns sem pigmentação, e nas ordens Rhabdomonales (organismos osmotróficos), Sphenomonadales (osmotróficos e fagotróficos) e Heteronematales (organismos fagotróficos), que compreendem apenas organismos sem pigmentos (Triemer e Farmer, 2007).

Apesar da grande diversidade das ordens que compõem a classe Euglenoidea, existem poucos estudos que visam entender o seu relacionamento. Na classe Euglenoidea, a mais estudada é a ordem Euglenales, que é dividida em nove gêneros: *Euglena*; *Phacus*; *Trachelomonas*; *Colacium*; *Lepocinclis*; *Strombomonas*; *Monomorphina*; *Cryptoglana* e *Discoplastis*. Estes organismos, coletivamente referidos como euglenídeos, são os principais gêneros de vida livre estudados no filo Euglenozoa, especialmente *Euglena gracilis*, um importante modelo para diversos estudos celulares e moleculares.

1.3.1.1 Morfologia dos euglenídeos

Os euglenídeos são organismos eucariontes unicelulares que apresentam diversas características morfológicas e ultra-estruturais, algumas utilizadas na sua identificação: a) flagelo com mastigonemas (fileiras de filamentos); b) grãos de paramilo que reservam carboidratos na forma de paramilo β -1: 3 glucan; c) estigma, com acúmulos de gotículas de lipídios sensíveis à luz; d) condensação dos cromossomos durante o ciclo celular (Leedale, 1967), (Fig. 2). Além destas características, os euglenídeos possuem uma película complexa, que consiste de uma membrana plasmática composta por estrias protéicas que se articulam com estrias adjacentes ao longo das margens laterais da célula de forma longitudinal ou helicoidal.

Alguns estudos sugerem que os diferentes modos de nutrição e locomoção estão intimamente relacionados com as características da película, especialmente quanto ao padrão e morfologia das estrias (Sommer e Blum 1965; Leander e Farmer, 2000). Esta associação se evidencia em euglenídeos rígidos, que não conseguem alterar a sua forma e apresentam estrias organizadas de forma longitudinal. Por outro lado, espécies de

Euglena apresentam uma película helicoidal que permite a metabolia ou “movimento euglenóide” (Fig. 3) (Leander *et al.*, 2001).

A diversidade das estruturas na película de euglenídeos tem sido analisada por diversos estudos a fim de definir caracteres úteis na sua classificação, tendo sido sugerido um modelo para a morfogênese de redução das estrias da película (Esson e Leander, 2006) que se mostrou útil em estudos taxonômicos e filogenéticos (Leander e Farmer, 2001; Leander *et al.*, 2001). Estes estudos descreveram padrões de estrias e poros presentes na superfície de vários euglenídeos e sugeriram que

Figura 2. Características morfológicas de euglenídeos. A) morfologia ilustrativa de *Euglena* representando as principais estruturas e organelas presentes em euglenídeos; B) flagelo visualizado por microscopia eletrônica de varredura, apresentando vários mastigonemas (filamentos); C) região anterior indicando (seta) o estigma visualizado por microscopia de luz; D) cloroplastos de euglenóides fotossintéticos e pirenóides (seta), visualizado por microscopia luz.

FONTE: As imagens A, C e D foram retiradas do Projeto Euglenóide (<http://euglena.msu.edu/>) e a imagem B obtida neste estudo.

Figura 3. Figuras ilustrativas do movimento euglenóide (metabolia) de *Euglena* sp.
 FONTE: Imagem Projeto Euglenóide (<http://euglena.msu.edu/>).

estas características podem ser úteis nos estudos filogenéticos destes taxa. Os diferentes padrões são definidos de acordo com a forma como as estrias se reduzem perto da região anterior e posterior da célula e com a distribuição dos corpos mucíferos pela película (Fig. 4). Visto que diferentes grupos de euglenídeos possuem padrões de película distintos, a associação destes dados morfológicos com estudos filogenéticos moleculares podem auxiliar na definição de grupos de euglenídeos (Leander e Farmer, 2000; Leander e Trimer, 2001; Leander *et al.*, 2001a, 2001b).

Os cloroplastos de euglenídeos apresentam clorofila A, B e carotenóides (Mullet, 1988). Esta organela apresenta três membranas e podem estar associada a pirenóides, que são estruturas especializadas responsáveis pela fixação de carbono (Fig. 2D). Os euglenídeos fotossintéticos são capazes de se orientar em direção à luz devido a uma associação do estigma com um fotorreceptor, que consiste de uma dilatação na base do flagelo, situado no interior do canal, em posição oposta a do estigma (Pringsheim, 1956; Wolken, 1977). A presença do estigma nos euglenídeos independe da presença dos cloroplastos, uma característica que difere de outros organismos que possuem esta estrutura (Leedale, 1967)(Fig. 2C).

1.4 O gênero *Euglena*

O gênero *Euglena* é considerado o mais estudado entre todos os gêneros que constituem os euglenídeos, devido à presença de características de plantas (autotrófico) e de animais (heterotrófico). As revisões mais recentes na taxonomia e sistemática evolutiva de diversos organismos se inspiraram neste gênero para nomear o filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981).

A primeira observação de euglenídeos do gênero *Euglena* foi atribuída a Antoine Van Leeuwenhoek (1674), um mercador holandês cuja curiosidade e habilidade com

Figura 4. Padrões das estrias e poros na película de *Euglena* evidenciados por microscopia eletrônica (ME). **A)** Padrões de redução de estrias na região anterior de *Euglena* sp. apresentando 1) 28 estrias na periferia da célula reduzidos exponencialmente (i) para 12 estrias e 2) ME de transmissão de corte transversal do canal com 56 estrias periféricas (setas) e 14 estrias distintas rodeando o canal (pontas de seta) indicando duas espirais de redução no canal; **B)** Espirais de redução na região posterior da célula: 1) ME de varredura de *E. gracilis* com 40 estrias na periferia reduzidas exponencialmente de 3 espirais de redução para 20 (I), 10 (II) e 5 (III) estrias; 2) padrão de redução linear em *E. mutabilis* com 3 espirais I, I' e II e 3) diagrama ilustrando o padrão linear de redução de 40 estrias para 30 (I), 20 (I') e 10 (II); **C)** Poros na película de *Euglena*: 1) ME de varredura de *E. laciniata* com 4 estrias entre poros; 2) ME de transmissão de corpos mucíferos (seta) de *E. perty* e 3) de *E. laciniata*.
FONTE: Leander e Farmer (2000) e Leander *et al.* (2001).

lentes permitiram a observação de diversos microorganismos, entre eles bactérias, nematóides, rotíferos e bodonídeos. Em 1667, em uma carta à Royal Society of London, Van Leeuwenhoek escreveu: “*These animalcules had divers colours, some being whitish and transparent; others with green and very glittering little scales; others again were green...And the motion of most of these animalcules in the water was so swift, and so various, upwards, downwards, and round about, that ’twas wonderful to see*”(Ford, 1981).

Um século mais tarde, Müller descreveu um organismo semelhante que denominou *Cercaria viridis*. No entanto, o gênero *Euglena* foi criado apenas em 1830, com as observações deste organismo por Ehrenberg, com *Euglena viridis* sendo denominada como espécie-tipo do gênero (Fig. 5) (Triemer e Farmer 2007).

E. gracilis é a espécie mais utilizada em diversos estudos, devido a facilidade de manter em laboratório. O efeito de luz, inibição química, temperatura e outros agentes importantes do desenvolvimento de cloroplastos e outras organelas podem ser estudados facilmente nessa espécie (Vacula *et al.*, 2007; Fugita *et al.*, 2008).

1.4.1 Taxonomia do gênero *Euglena*

A taxonomia do gênero *Euglena* acompanhou a taxonomia dos euglenídeos, onde os primeiros estudos atribuíam grande importância à presença ou ausência de cloroplastos. Conseqüentemente, esses parâmetros foram refletidos nas primeiras tentativas de organização do gênero *Euglena*. Variações na morfologia dos cloroplastos (forma de laço, estrela ou disco) levaram à divisão do gênero *Euglena* nos grupos I, II e III por Lemmerman em 1913. Chu em 1947 associou a presença de pirenóides à morfologia dos cloroplastos, dividindo o gênero *Euglena* em quatro grupos. Por sua vez, quando o número de cloroplastos foi associado à sua morfologia, o gênero *Euglena* foi subdividido em oito grupos de A-H por Gojdics em 1953 (Johnson, 1968).

O estudo de Hollande (1942, 1952), que sugeria que a separação de euglenídeos com e sem cloroplastos gerava grupos artificiais, repercutiu na taxonomia do gênero *Euglena* (Pringsheim, 1948). Assim, os parâmetros morfológicos do cloroplasto foram refinados e associados ao formato da célula e ao grau de metabolia, dividindo o gênero em seis grupos (Rigidae, Lentiferae, Catilliferae, Radiatae, Serpentes e Limpidae), que incluíram, pela primeira vez, espécies sem pigmentação em uma subdivisão do gênero *Euglena* (Pringsheim, 1956).

Figura 5. Desenhos originais de Ehrenberg (1830) de *E. viridis*, a espécie tipo do gênero *Euglena*, depositados na Coleção Ehrenberg do “Museum für Naturkunde der Humboldt-Universität”, Berlin, Alemanha.
 FONTE: Imagem obtida do Projeto Euglenóide (<http://euglena.msu.edu/>).

Em 1986, Zakrýs revisou os caracteres utilizados por Pringsheim (1956) e subdividiu o gênero *Euglena* em três subgêneros: *Euglena*, *Caliglana* e *Discoglana*. Atualmente, as propostas taxonômicas de Pringsheim (1956) e de Zakrýs (1986) são utilizadas e consideradas válidas para a taxonomia do gênero *Euglena*. Ainda não foi estabelecida uma classificação oficial reconhecida pela comunidade científica.

1.4.2 Morfologia de espécies do gênero *Euglena*

Os membros do gênero *Euglena* apresentam grandes variações no comprimento da célula (10-400 μm), podendo variar de tamanho dentro de uma mesma espécie de acordo com a fase de crescimento em cultura, ou com a fase do ciclo celular (Gojdic, 1953; Johnson, 1968). O formato da célula varia de formas esféricas, cilíndricas ou fusiformes (afilada em direção às extremidades) (Fig.6). No entanto, o formato da célula pode ser alterado devido à metabolia da célula, o “movimento euglenóide” característico deste grupo (Fig. 3). Além do formato geral da célula, as características da região anterior e posterior da célula também podem ser utilizadas como parâmetros morfológicos deste gênero (Fig. 6).

Os cloroplastos de *Euglena* podem ser únicos ou numerosos, além de variar no seu posicionamento na célula (central, parietal ou disperso) e em seu formato (Fig. 6). Devido à presença de clorofila nos cloroplastos, a grande maioria das espécies de *Euglena* exibe uma coloração verde. As espécies osmotróficas, *E. longa* e *E. quartana*, não possuem cloroplastos. No entanto, foi demonstrado por metodologias moleculares que *E. longa* possui um genoma de cloroplasto, porém, os genes responsáveis por fotossíntese estão ausentes (Gockel e Hatchel, 2000). Estudos prévios demonstraram experimentalmente que amostras de *E. gracilis* que perderam os seus cloroplastos (temporária ou permanentemente) continuaram a se dividir normalmente (Pringsheim e Pringsheim, 1952). Além de espécies verdes e sem coloração, algumas espécies de *Euglena* podem apresentar pequenos grânulos vermelhos (hematocromos) que se dispersam no citoplasma quando expostos a altas temperaturas ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$), conferindo à célula uma coloração avermelhada (Buetow, 1968).

Os cloroplastos podem por vezes estar associados a pirenóides, que são áreas especializadas do cloroplasto que contêm grandes concentrações da enzima Rubisco (ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase) responsável pela fixação de dióxido de carbono durante a fotossíntese (Osafune *et al.*, 1990). Os grãos de paramilo de *Euglena*, que são responsáveis pelo armazenamento de carboidratos, exibem variações de tamanho, além de apresentar formas diferentes (redondo, oval ou tubular). A maioria das células de uma mesma espécie apresenta apenas um tipo morfológico de grãos de paramilo (monomórfico), mas algumas espécies podem apresentar grãos de diferentes tamanhos e formatos na mesma célula (dimórficos).

Estudos morfológicos continuam a auxiliar na distinção de espécies de *Euglena*. Recentemente, estudos detalhados da ultra-estrutura da película, cloroplastos,

Figura 6. Parâmetros morfológicos utilizados para espécies de *Euglena* representadas esquematicamente e por microscopia de luz. **A)** Formato da célula: 1) arredondada; 2) fusiforme; 3) afunilada nas duas pontas; 4) cilíndrica; **B)** Formato da região anterior: 1) arredondada; 2) afunilada; 3) alongada; 4) truncada; **C)** Formato da região posterior: 1) arredondada; 2) alongada; 3) com cauda e **D)** Formato dos cloroplastos: 1) discóide; 2) ovóide; 3) laço.

FONTE: Imagens obtidas de “Lucid key to the genus *Euglena*”, University of Queensland, obtidas no endereço eletrônico: (<http://bio.rutgers.edu/euglena/taxkeys.htm>).

pirenóides e outras organelas permitiram observar diferenças entre algumas espécies do subgrupo “Serpentes” do gênero *Euglena* (*E. satellites*, *E. carterae*, *E. adhaerens*, *E. tatrlica*), embora *E. intermedia* and *E. mutabilis* não tenham sido comparadas neste estudo (Kusel-Fetzmann e Weidinger, 2008).

1.4.3 Ecologia do gênero *Euglena*

Os euglenídeos são organismos de vida livre, autotróficos ou heterotróficos, capazes de habitar uma grande variedade de ambientes. Espécies de *Euglena* já foram descritas em solo, água doce, salobra e salgada, assim como em ambientes limpos e poluídos. Além disso, algumas espécies de *Euglena* são usadas como indicadoras de poluição orgânica devido à sua ocorrência em tanques de oxidação de esgotos (Wehr e Sheath, 2003). Durante os processos de purificação de água, é muito comum encontrar espécies de *Euglena*, mesmo em águas que recebem efluentes ácidos. Alguns estudos já relataram até 76 espécies diferentes de algas e euglenídeos, com *E. mutabilis* sendo a mais abundante e amplamente distribuída, demonstrando a capacidade dessa espécie de se desenvolver tanto em águas alcalinas como ácidas, além de águas com baixo ou alto teor de minerais (Wehr e Sheath, 2003).

Em estudos de resíduos industriais na água, *E. gracilis* foi a única espécie fotossintética detectada. Estes fatores tornaram *E. gracilis* um excelente modelo para estudos bioquímicos dos mecanismos de resistência a metais pesados que se associam e acumulam nos cloroplastos (Rodriguez-Zavala *et al.*, 2007). Devido a estas características, existem diversos estudos de alterações eco-fisiológicas induzidas em *E. gracilis*, causadas por contaminação de água com metais pesados e componentes organometálicos, observadas por análises ultra-estruturais e biológicas (Conforti *et al.*, 1991, 1995). Além disso, diferenças bioquímicas e de crescimento foram descritas em uma amostra de *E. gracilis* isolada de um rio altamente poluído na Argentina (Ruiz *et al.*, 2004). Portanto, estudos de alterações celulares e bioquímicas que ocorrem em *Euglena* e outros euglenídeos em diferentes condições ambientais têm sido empregados como parâmetros indicativos de mudanças ambientais induzidas por matéria orgânica, metais pesados e outros contaminantes (Conforti *et al.*, 1991, 1995; Stallwitz e Hader, 1994; Gajdosova e Reichrtpva, 1996; Eininicker-Lamas *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2004; Rodriguez-Zavala *et al.*, 2007).

Devido à sua abundância e tamanho, é provável que espécies de *Euglena* sirvam de alimento para ciliados, rotíferos, nematóides e larvas de insetos (Lackey, 1968). No

entanto, em situações de stress, os corpos mucíferos de *Euglena* secretam um muco ao redor da célula que forma um “cisto” resistente, permitindo que células viáveis de *Euglena* fossem recuperadas no intestino e nas fezes de girinos e insetos. Este “encistamento” é observado também em culturas de *Euglena* antigas e, provavelmente, ocorre como uma forma de proteção quando as condições não são favoráveis ao seu desenvolvimento. Em alguns casos, as células “encistadas” são capazes de se dividir, tendo sido observados agrupamentos de até 64 células de *Euglena* (Buetow, 1968).

1.5 Critérios taxonômicos utilizados na classificação do gênero *Euglena*

1.5.1 Características morfológicas e fisiológicas

As espécies que constituem o gênero *Euglena* são extremamente diversas, classificadas em diferentes subgêneros ou subgrupos de acordo com características morfológicas variadas, tais como tamanho e forma da célula e presença ou ausência de determinadas estruturas e organelas. A análise conjunta destas características tem sido utilizada na classificação de euglenídeos em diferentes gêneros e espécies. Entretanto, a distinção morfológica das espécies nem sempre é fácil, exige muita experiência, e pode levar a inúmeros erros de classificação, principalmente entre espécies do gênero *Euglena*.

Além das características específicas dos euglenídeos (item 1.3.1.1), a classificação de organismos no gênero *Euglena* obedece a diferentes parâmetros morfológicos e fisiológicos que auxiliam na classificação do gênero (item 1.4.2, Fig. 6). A utilização destes parâmetros taxonômicos clássicos (morfológicos e fisiológicos) permitiu identificar uma série de novas espécies de *Euglena* em diferentes ambientes e regiões do mundo. No Brasil, são poucos os estudos que identificaram espécies de *Euglena* e outros euglenídeos dos gêneros *Lepocinclis*, *Trachelomonas* e *Phacus* (Conforti, 1994; Xavier, 1994; Alves da Silva e Fortuna, 2006).

Além destes parâmetros, as características da película de *Euglena* têm sido estudadas em combinação com estudos filogenéticos moleculares. Um estudo recente mostrou, mais uma vez, a grande complexidade de *Euglena*, revelando na espécie marinha *E. obtusa* a película mais complexa observada nesse gênero (Esson e Leander, 2008).

1.5.2 Genes e seqüências utilizadas nas inferências de relações filogenéticas do gênero *Euglena*

1.5.2.1 Gene ribossômico

Os eucariotos compartilham um DNA ribossômico (rDNA) que apresenta uma estrutura complexa e distinta, freqüentemente utilizada em inferências de relacionamento filogenético (Hillis e Dixon, 1991). O gene ribossômico dos membros do filo Euglenozoa estão presentes em múltiplas cópias que se repetem por aproximadamente 100 vezes em “*tandem*” no genoma, e consiste de uma unidade de transcrição (cistrons ribossômicos) separada por espaçadores intergênicos (IGS) (Hillis e Dixon, 1991). O processamento do rDNA ocorre em uma única unidade de transcrição, onde o pré-RNA é sintetizado pela RNA polimerase I, seguido por diversas etapas de processamento. Esse processo resulta em duas subunidades de RNA maduro, a subunidade menor SSU (18S) e a subunidade maior LSU (24S). A LSU é constituída por dois fragmentos de alto peso molecular, 24S α e 24S β e quatro subunidades de rRNAs maduros de baixo peso molecular (S1, S2, S3 e S6). As subunidades 18S e 24S são constituídas por seqüências altamente conservadas e intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS (espaçador interno transcrito) (Fig. 7).

As seqüências do gene ribossômico têm-se revelado úteis em análises filogenéticas e evolutivas uma vez que esta região é funcionalmente equivalente em todos os organismos conhecidos (Sogin *et al.*, 1986). Além disso, diferentes regiões do gene ribossômico exibem diferentes graus de variabilidade, sendo possível analisar regiões variáveis ou conservadas para inferências filogenéticas (Hillis e Dixon, 1991). As regiões conservadas são úteis na construção de oligonucleotídeos que permitem amplificar por PCR o gene ribossômico de organismos distintos. A subunidade menor do gene

Figura 7. Representação esquemática do cistron ribossômico de *Euglena*.

ribossômico (SSU) tem sido utilizada com muita frequência em análises filogenéticas de protozoários devido à facilidade de amplificação por PCR e presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas, que são fundamentais para a obtenção de alinhamentos confiáveis. Estas características tornaram a utilização de seqüências do gene ribossômico uma excelente ferramenta em estudos filogenéticos e evolutivos.

Em euglenídeos, o gene ribossômico foi primeiramente empregado em filogenias moleculares em 1986, quando Sogin *et al* determinaram as seqüências da SSU rDNA de *Euglena gracilis* e *Trypanosoma brucei*. Neste estudo, foi sugerido que *Euglena* e *Trypanosoma* representavam, na árvore dos eucariotos, organismos que divergiram antes da grande radiação evolutiva que originou as plantas, animais, fungos e outros grupos de protozoários (Sogin *et al.*, 1986). Em 1997, Montegut-Felkner e Triemer realizaram um estudo baseado nas seqüências da SSU rDNA de quatro representantes de euglenídeos (um fotossintético, um osmotrófico e dois fagotróficos) e cinetoplastídeos. Os euglenídeos utilizados neste estudo apresentaram uma distância genética muito maior entre eles do que com os cinetoplastídeos (Montegut-Felkner e Triemer, 1997). Outros estudos mais abrangentes de membros do filo Euglenozoa confirmaram que os euglenídeos estão entre os grupos mais divergentes de eucariotos, e que os seus taxa apresentam uma grande diversidade intra-genérica e, até mesmo, intra-específica (5,89 – 24,75%) em relação aos cinetoplastídeos (0,1 – 4,03%) (Preisfeld *et al.*, 2000; Busse e Preisfeld, 2002).

A maioria dos estudos filogenéticos de euglenídeos foi concentrada na SSU rDNA, com poucos estudos que visavam resolver as relações entre organismos proximamente relacionados, preferindo analisar os euglenídeos como um todo. À medida que novos taxa eram acrescentados nas filogenias, ficou evidente que vários gêneros da ordem Euglenales eram parafiléticos ou polifiléticos. Algumas espécies, como *E. anabaena*, ficaram fora do clado contendo todos os outros gêneros da ordem Euglenales (*Phacus*, *Lepocinclis* e *Euglena*). Outras espécies, como *E. acus* e *E. spirogyra*, foram posicionadas junto com espécies de *Phacus* e *Lepocinclis* (Linton *et al.*, 1999, 2000; Nudelman *et al.*, 2003). Assim, estes estudos já demonstravam a necessidade de revisão na taxonomia da ordem Euglenales. Em 2003, com o aumento do número de seqüências disponíveis de espécies da família Euglenales, dois trabalhos observaram que *Astasia longa* e *Khawkinea quartana* (espécies osmotróficas sem pigmentação) ficavam posicionadas em um clado junto com espécies fototróficas de *Euglena* (Marin *et al.*, 2003; Nudelman *et al.*, 2003). A análise de um maior número de seqüências de SSU rDNA resultou na

transferência de algumas espécies rígidas de *Euglena* (*E. acus*, *E. spirogyra*, *E. oxyuris*, *E. tripteris*, *E. spiroides* e *E. platydesma*) para o gênero *Lepocinclis* (Marin *et al.*, 2003).

Mais tarde, características morfológicas do gênero *Euglena* foram associadas com a filogenia das duas subunidades do gene ribossômico, 18S e 24S rDNA, resultando em oito clados de *Euglena*: Stellata I, Laciniata, Stellata II, Geniculata, Cantabrica, Viridis, Gracilis e Mutabilis (Shin e Triemer, 2004). No entanto, apesar da segregação em clados distintos, não foi obtido um suporte forte para estes agrupamentos. Além disso, este estudo revelou que a espécie-tipo do gênero, *E. viridis*, é uma espécie críptica, morfológicamente idêntica a *E. stellata*, tendo sido segregada em clados distintos por análises moleculares (Shin e Triemer, 2004). Assim, a discrepância entre dados moleculares e morfológicos observada neste estudo, enfatizou a necessidade de se estudar os relacionamentos intra-específicos de *Euglena* e dos restantes euglenídeos (Shin e Triemer, 2004).

Em 2006, um estudo filogenético combinado do 18S e 24S rDNA foi realizado com 84 isolados da ordem Euglenales, representando 11 gêneros (Triemer *et al.*, 2006). Este estudo revelou três clados principais formados pelos gêneros *Phacus*, *Lepocinclis* e *Euglena*, além de resultar na criação do gênero *Discoplastis*, criado para reclassificar duas espécies de *Euglena* sem pirenóides (*E. spathirhyncha* e *E. cf. adunca*). Com este estudo, o gênero *Euglena* se apresentou monofilético pela primeira vez, sendo denominado grupo H dos euglenídeos e subdividido em H1, H2 e H3 (Triemer *et al.*, 2006) (Fig. 8), apesar do gênero *Euglena* ter sido previamente denominado como grupo A com base em análises da SSU rDNA (Nudelman *et al.*, 2003).

Simultaneamente ao estudo de Triemer *et al.*, (2006) um trabalho utilizou seqüências combinadas dos genes 16S do cloroplasto e 18S rDNA (Milanowski *et al.*, 2006). Este estudo resultou em um forte suporte para o gênero *Euglena* e sugeriu que fosse restrito às espécies do clado A (A1, A2 e A3), visto que *E. spathirhyncha* se posicionou fora do gênero *Euglena* (Fig. 9). Este trabalho salientou a necessidade de outros estudos, uma vez que isolados da mesma espécie foram segregados em clados distintos (*E. chadefaudii* e *E. stellata*). Como os clados A2 e A3 se apresentaram parafiléticos, Milanowski *et al.* (2006) sugeriu que fossem designados subgêneros distintos e que o subgênero *Calliglena* de Zakrýs (1986) fosse abandonado ou modificado (Milanowski *et al.*, 2006).

Um estudo de relacionamento filogenético baseado nas seqüências do 5S rDNA analisou 7 espécies (incluindo *E. gracilis*) e algumas seqüências de cinetoplastídeos. Este estudo apenas conseguiu demonstrar que os euglenídeos mais relacionados são *E.*

Figura 8. Árvore filogenética baseada na análise combinada de seqüências da SSU rDNA e LSU rDNA de espécies do gênero *Euglena* construída por análises bayesianas. Os números representam os valores de probabilidade à posteriori (pp). Valores < 0.80 foram omitidos.
FONTE: Triemer *et al.*, 2006.

gracilis, *Cyclidiopsis acus* (syn *Lepocinclis acus*) e *Phacus curvicauda*, que diferem de um grupo muito heterogêneo formado por euglenídeos heterotróficos (*Entosiphon sulcatum*, *Distigma proteus*, *Menoidium pellucidum* e *Rhabdomonas costata*). Assim, este estudo sugeriu que espécies que têm ou tiveram cloroplastos (*E. gracilis*, *P. curvicauda*, *C. acus*) divergiram antes das outras (Frantz *et al.*, 2000).

1.5.2.2 Genes de cloroplasto

Os cloroplastos são organelas responsáveis pela fotossíntese, encontradas em plantas terrestres, algas eucariotes e euglenídeos. Esta organela apresenta membranas duplas, DNA próprio e uma origem endossimbionte. Acredita-se que os cloroplastos

Figura 9. Árvore filogenética baseada na análise combinada de seqüências do gene nuclear SSU rDNA e de 16S rDNA do cloroplasto de euglenídeos, inferida por análises bayesianas. Valores < 0.75 foram omitidos. Números nos retângulos representam os valores de probabilidade à posteriori (BA), “bootstrap” por Máxima Parsimonia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV).
 FONTE: Milanowski *et al.*, 2006

tenham sido originados de organismos procariontes fotossintéticos (algas azuis) que se instalaram em células primitivas eucariontes por endossimbiose. Durante o processo evolutivo, as bactérias precursoras dos cloroplastos transferiram parte do seu material genético para o DNA da célula hospedeira e, assim, passaram a depender do genoma da célula hospedeira para a produção de muitas das suas proteínas.

Os cloroplastos são organelas altamente poliplóides que contêm moléculas de DNA circulares de 85 a 200 kb. O genoma do cloroplasto de *Euglena gracilis* tem 145 kb

sendo distinto dos genomas de cloroplastos de algas clorófitas ou de plantas terrestres (Hallick *et al.*, 1993).

Os primeiros estudos filogenéticos que utilizavam genes do cloroplasto foram realizados com o gene codificante da enzima Rubisco (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase), responsável pela fixação do gás carbônico na fotossíntese (Thompson *et al.*, 1995). Além deste estudo que utilizou apenas *E. gracilis*, análises com seqüências de genes do cloroplasto (16S rDNA) de 10 espécies de *Euglena* foram inferidas por diferentes métodos (Milanowski *et al.*, 2001). Este estudo analisou, além de *Euglena*, representantes dos gêneros *Phacus*, *Colacium*, *Lepocinclis*, *Strombomonas*, *Trachelomonas* e *Eutreptia*. Devido à complexidade da taxonomia de algumas espécies de *Euglena*, o gênero foi considerado polifilético por agrupar espécies de *Euglena* e dos gêneros *Colacium*, *Strombomonas* e *Trachelomonas* (Milanowski *et al.*, 2001). Mais tarde, análises combinadas de seqüências de genes do cloroplasto (16S rDNA) e do gene ribossômico nuclear 18S rDNA resolveram melhor o relacionamento entre as espécies do gênero *Euglena*, que foi separado em três clados bem suportados: A1, A2 e A3. Entretanto, esses clados se revelaram pouco associados aos subgêneros reconhecidos pela taxonomia morfológica (Milanowski *et al.*, 2006).

Recentemente, a subunidade maior (LSU) dos genes do cloroplasto (23S rDNA) foi utilizada em um estudo filogenético muito abrangente de membros da ordem Euglenales, que incluiu 101 seqüências de 9 gêneros (*Euglena*, *Trachelomonas*, *Strombomonas*, *Monomorphina*, *Cryptoglana*, *Colacium*, *Discoplastis*, *Phacus* e *Lepocinclis*). Este estudo também suportou a monofilia do gênero *Euglena* (Kim e Shin, 2008), dividido em três clados principais, sem relação com os subgêneros definidos por taxonomia morfológica. O gênero *Euglena* foi dividido em três grupos (E1, E2 e E3) que, por sua vez, não correspondem aos grupos A1, A2 e A3 definidos por Milanowski *et al* (2006) para os membros desse gênero. E3 corresponde às espécies dos clados A2 e A3, além de *E. anabaena* e *E. proxima*, enquanto E1 e E2 são subdivisões do clado A1.

As seqüências de genes de cloroplasto da subunidade LSU 23SrDNA geraram outro conjunto de dados que foi avaliado para inferir filogenias de *Euglena* e euglenídeos. As filogenias baseadas nesses genes não nucleares geraram árvores filogenéticas mal resolvidas comparadas com as obtidas com os genes nucleares (SSU) e de cloroplasto (16S) analisados sozinhos ou combinados (Triemer *et al.* 2006). Porém, apesar dos estudos recentes com diversas seqüências de LSU 23SrDNA, inclusive de espécies de *Euglena* nunca antes incluídas em estudos filogenéticos (Kim e Shin, 2008), o

relacionamento dos grupos de *Euglena* ainda é bastante complexo devido à enorme divergência genética entre as espécies que compreendem este gênero.

1.5.2.3 Sequências de genes codificadores de proteínas

As análises de sequências de genes que codificam proteínas têm-se revelado uma ferramenta auxiliar importante em estudos filogenéticos moleculares de organismos do filo Euglenozoa. Estudos filogenéticos baseados em sequências de genes que codificam proteínas mitocondriais e nucleares permitiram resolver relações filogenéticas intra-específicas de diferentes gêneros, principalmente de cinetoplastídeos (Hannaert *et al.*, 1992, 1998; Hashimoto *et al.*, 1995; Adjé *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2004). Além disso, estes estudos apresentaram filogenias muito congruentes com estudos baseados no gene ribossômico (Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004, 2005; Simpson *et al.*, 2006; Stevens, 2008).

Em euglenídeos, são poucos os estudos que utilizam sequências gênicas de proteínas, sendo geralmente utilizadas em estudos abrangentes dos aspectos evolutivos do filo Euglenozoa, que normalmente incluem apenas uma sequência de *E. gracilis* (Keeling e Doolittle, 1996; Baldauf *et al.*, 1996; Baldauf *et al.*, 2000; Simpson e Roger, 2004; Sun *et al.*, 2008).

As proteínas de choque térmico, *Heat shock proteins* (Hsp) são extremamente conservadas nos eucariotos devido à função de defesa contra mudanças de ambiente e outras agressões externas (Schlesinger, 1990), e têm sido utilizadas em estudos filogenéticos de vários membros do filo Euglenozoa. Filogenias utilizando os genes Hsp90 e Hsp70 foram empregadas para entender o relacionamento dos grupos que compõem os Euglenozoa (euglenídeos, diplomonídeos e cinetoplastídeos), que são bastante estudados por sequências da SSU rDNA (Simpson e Roger, 2004). Em euglenídeos, *Petalomonas cantuscygni*, *Entosiphon sulcatum* e *Peranema trichophorum* foram analisados em filogenias baseadas nos genes de Hsp90 (forma citosólica). Nesse estudo, a mesma relação entre as classes do filo Euglenozoa foi evidenciada, sendo o gênero *Petalomonas* basal entre os euglenídeos comparados (Breglia *et al.*, 2007).

As sequências dos genes *par1* e *par2* que codificam as duas proteínas majoritárias do bastão paraxonemal (PAR) foram utilizadas para inferências filogenéticas entre euglenídeos e cinetoplastídeos (Talke e Preisfeld, 2002). A estrutura flagelar dos Euglenozoa é considerada uma apomorfia do filo, sendo formada por dois elementos estruturais: o axonema constituído por microtúbulos com proteínas que permitem o

movimento do flagelo e uma estrutura protéica altamente organizada de função desconhecida, o bastão paraxonemal (PAR). As seqüências dos genes *par1* e *par2* de cinetoplastídeos e euglenídeos foram agrupados em análises filogenéticas e apresentaram similaridades, sugerindo eventos de duplicação gênica antes da divergência dos euglenídeos e cinetoplastídeos (Talke e Preisfeld, 2002). Além disso, as filogenias inferidas com os genes PAR estão de acordo com os estudos baseados na SSU rDNA, que revelaram ramos que separaram os euglenídeos nos clados com organismos osmotróficos primários e fototróficos, incluindo os osmotróficos secundários. Assim, estes resultados sugerem que estes genes podem ser uma ferramenta útil na análise de euglenídeos (Talke e Preisfeld, 2002).

Recentemente, a seqüência do gene DHOD (dihydrorotato dehidrogenase) de *E. gracilis* foi utilizada em um estudo filogenético e evolutivo de cinetoplastídeos (Annoura *et al.*, 2005). Em cinetoplastídeos, a DHOD é quarta enzima da via de biosíntese da pirimidina, localizada no citosol e utiliza um receptor de fumarato (atividade de redutase fumarato), enquanto a enzima de outros eucariotos é ligada à membrana mitocondrial. A análise filogenética dos genes de DHOD em alguns organismos do filo Euglenozoa revelou que os euglenídeos (*E. gracilis*) têm uma DHOD mitocondrial e que os bodonídeos apresentam a DHOD citosólica. Este estudo sugere que o ancestral comum dos Euglenozoa apresentava uma DHOD mitocondrial, presente em seu descendente *E. gracilis* e que o ancestral de cinetoplastídeos (bodonídeos e tripanossomatídeos) adquiriram subsequente a DHOD citosólica por transferência horizontal. Este evento pode ter contribuído para a adaptação anaeróbica na linhagem dos cinetoplastídeos e ao estabelecimento do parasitismo no ancestral dos tripanossomatídeos (Annoura *et al.*, 2005).

CONCLUSÃO

Este estudo corroborou a alta complexidade do gênero *Euglena*, revelando novos clados e permitindo a identificação de 6 novas espécies. Isolados representativos de cada espécie definida nas inferências filogenéticas foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens obtidas apresentaram 2 perfis principais de estrias e padrões de poros da película compartilhados por isolados de clados distintos. Apenas os isolados do clado *Braziliensis* exibiram padrões específicos na redução das estrias. As análises filogenéticas não permitiram correlacionar os clados definidos com o habitat e bioma de origem dos isolados.

Estas são as primeiras espécies de *Euglena* descritas no Brasil estabelecidas em cultura, validadas por análises filogenéticas moleculares e morfologicamente caracterizadas por análises de microscopia de luz e eletrônica de varredura.

REFERÊNCIAS

Adjé CA, Oppendoes FR, Michels PA. Molecular analysis of phosphoglycerate kinase in *Trypanoplasma borreli* and the evolution of this enzyme in kinetoplastida. *Gene*. 1998; 217(1-2): 91-99

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Anderson RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Frederico S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2005, 52(5): 399-451

Alves-da-Silva SM, Fortuna JR. Euglenophyceae de ambientes lênticos na planície costeira do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil: gêneros *Euglena* Ehr. e *Lepocinclis* Perty. *Acta Botanica Brasilica*. 2006; 20(2): 411-422

Annoura T, Nara T, Makiuchi T, Hashimoto T, Aoki T. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. *Journal of Molecular Evolution*. 2005; 60(1):113-27.

Atkins MS, Teske AP, Anderson OR. A survey of flagellate diversity at four deep-sea hydrothermal vents in the Eastern Pacific Ocean using structural and molecular approaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2000;47(4):400-11.

Baldauf S. The deep roots of eukaryotes. *Science*. 2003; 300 (5626): 1703-1706

Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert, Doolittle WF. A Kingdom-level phylogeny of Eukaryotes based on combined proteína data. *Science*. 2000; 290: 972-977

Baldauf SL, Palmer JD, Doolittle WF. The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1996; 23;93(15):7749-7754

Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2007; 54(1):86-92.

Buetow DE. Morphology and ultrastructure of *Euglena*. In: Buetow DE, editor. *The biology of Euglena*, Vol 1 General Biology and ultrastructure. 1968. Academy Press, New York

Busse I, Preisfeld A. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia* (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003; 53(2):617-24.

Busse I, Preisfeld A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. 2002; 55(6):757-67.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Callahan HA, Litaker RW, Noga EJ. Molecular taxonomy of the suborder Bodonina (Order Kinetoplastida), including the important fish parasite, *Ichthyobodo necator*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2002; 49(2):119-28.
- Cavalier-Smith T e von der Heyden S. Molecular phylogeny, scale evolution and taxonomy of centrohelid heliozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007; 44(3):1186-203.
- Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society B*. 2004; 271(1545):1251-1262.
- Cavalier-Smith T. The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003; 53(6): 1741-1748
- Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52(2):297-354.
- Cavalier-Smith T. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origin and the eukaryote family tree. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999; 46: 347-366
- Cavalier-Smith T. Zooflagellate phylogeny and classification. *Tsitologia*. 1995; 37(11): 1010-1029
- Cavalier-Smith T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Bio Systems*. 1981; 14(3-4):461-481.
- Conforti V, Alberghina J, Urda EG. Structural changes and dynamics of phytoplankton community along a highly polluted river of Argentina (Matanza-Riachuelo). *Journal of Aquatic Ecosystem Health*. 1995; 4; 59-75
- Conforti V. Study of the Euglenophyta from Cameleão lake (Manaus-Brazil). III. *Euglena* Ehr., *Lepocinclis* Perty, *Phacus* Duj. *Revue d'Hydrobiologie tropicale*. 1994; 27(1): 3-21
- Countway PD, Gast RJ, Dennett MR, Savai P, Rose JM, Caron DA. Distinct protistan assemblages characterize the euphotic zone and deep sea (2500 m) of the western North Atlantic (Sargasso Sea and Gulf Stream). *Environmental Microbiology*. 2007; 9(5): 1219-1232
- Dolezel D, Jirku M, Maslov DA, Lukes J. Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small-subunit rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000; 50:1943-51.
- Einicker-Lamas M, Mezan GA, Fernandes TB, Silva FLS, Guerra F, Miranda K, Attias M, Oliveira MM. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environmental Pollution*. 2002; 120(3): 779-786

- Esson HJ, Leander BS. Novel pellicle surface patterns on *Euglena obtusa* (Euglenophyta) from the marine benthic environment: implications for pellicle development and evolution. *Journal of Phycology*. 2008; 44: 132-141
- Esson HJ, Leander BS. A model for the morphogenesis of strip reduction patterns in phototrophic euglenids: evidence for heterochrony in pellicle evolution. *Evolution & Development*. 2006; 8:378-388
- Felsenstein J. Phylip-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*; 1989; 5: 164-166
- Frantz C, Ebel C, Paulus F, Imbault P. Characterization of *trans-splicing* in Euglenoids. *Current Genetics*. 2000; 37: 349-355
- Ford BJ. The van Leeuwenhoek Specimens. *Notes and Records of the Royal Society of London*. 1981; 36(1): 37-59
- Fugita T, Aoyagi H, Ogbonna JC, Tanaka H. Effect of mixed organic substrate on alpha-tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008; 79(3): 371-378
- Gajdosova J, Reichrtova E. Different growth response of *Euglena gracilis* to Hg, Cd, Cr, and Ni compounds. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1996; 354 (5-6): 641-642
- Gibbs SP. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1981; 361: 193-208
- Gibbs SP. The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Canadian Journal of Botany*. 1978; 56: 2883-2889
- Godjics M. The genus *Euglena*. 1953; The University of Wisconsin Press Madison. pp 268
- Gockel G, Hatchel W. Complete gene map of the plastid genome of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Protist*. 2000; 151: 347-351
- Hallick RB, Hong L, Drager RG, Favreu MR, Monfort A, Orsat B, Spielmann A, Stutz E. Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research*. 1993; 21:3537-3544.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol*. 2005; 35(4):431-43
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International journal for parasitology*. 2004; 34(12):1393-404.
- Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora JP, Rigden DJ, Michels PA, Opperdoes FR. Plant-like traits associated with metabolism of Trypanosoma parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2003; 100(3): 1067-1071

Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *Journal of Molecular Evolution*. 1998; 47(6): 728-738

Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Opperdoes FR, Michels PA. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992; 55(1-2): 115-126

Hashimoto T, Nakamura Y, Kamaishi T, Adachi J, Nakamura F, Okamoto K, Hasegawa M. Phylogenetic place of kinetoplastid protozoa inferred from a protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995; 70(1-2): 181-185

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*. 1991; 66(4):411-453.

Hollande A. Classe des Euglénien (Euglenoidina Butschli, 1884). *Traité de Zoologie*, vol. I. fasc. 1 [ed.] P.P. Grasse, Paris: Masson et cie. 1952; pp 238-284

Hollande A. Etude cytologique et biologique de quelques flagellés libres. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale*. 1942; 83:1-268.

Hollar L, Lukes J, Maslov DA. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1997; 45(3):293-7.

Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997; 89:295-9.

Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Molecular Biological and Evolution*. 2003; 20(4):644-52.

Johnson LP. The taxonomy, phylogeny, and evolution of the genus *Euglena*. In: Buetow DE, editor. *The biology of Euglena*, Vol 1 General Biology and ultrastructure. 1968. Academy Press, New York

Keeling PJ, Burger G, Durnford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, Roger AJ, Gray MW. The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*. 2005; 20 (12): 670-676

Keeling PJ e Doolittle WF. Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biological and Evolution*. 1996; 13: 1297-1305

Kent ML, Elston RA, Nerad TA, Sawyer TK. An *Isonema*-like flagellate (Protozoa: Mastigophora) infection in larval geoduck clams, *Panope abrupta*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1987; 50: 221-229

Kim IJ e Shin W. Phylogeny of the euglenales inferred from plastid LSU rDNA. *Journal of Phycology*. 2008; 44(4):994-1000.

Kusel-Fetzmann E, Weidinger M. Ultrastructure of five *Euglena* species positioned in the subdivision Serpentes. *Protoplasma*. 2008; 223(3-4): 209-222

Lackey JB. Ecology of *Euglena*. In: Buetow DE, editor. The biology of *Euglena*, Vol 1 General Biology and ultrastructure. 1968. Academy Press, New York

Lara E, Moreira D, Vereshchaka A, López-García P. Pan-oceanic distribution of new highly diverse clades of deep-sea diplomonads. Environmental Microbiology. In press 2008

Leander BS. Did trypanosomatids parasites have photosynthetic ancestors? Trends in Microbiology. 2004; 12: 251-258

Leander BS, Triemer RE, Farmer MA. Character evolution in heterotrophic euglenids. European Journal of Protistology. 2001a; 37: 337-356

Leander BS, Witek RP, Farmer MA. Trends in the evolution of the euglenid pellicle. Evolution; international journal of organic evolution. 2001b; 11; 55(11):2215-35.

Leander BS, Farmer MA. Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 2000; 47(5):469-79.

Leedale GF. Phylogenetic criteria in euglenoid flagellates. BioSystems. 1978; 10: 183-187

Leedale GF. Euglenoid Flagellates. 1967; Prentice Hall, Englewood cliffs, New Jersey

Linton EW, Nudelman MA, Conforti V, Triemer RE. A molecular analysis of the euglenophytes using SSU rDNA. Journal of Phycology. 2000; 36:740-746

Linton EW, Hittner D, Lewandowski C, Auld T, Triemer RE. A molecular study of euglenoid phylogeny using small subunit rDNA. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 1999; 46(2):217-23.

López-García P, Vereshchaka A, Moreira D. Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid-seawater interface in Lost City hydrothermal Field. Environmental Microbiology. 2007; 9(2): 546-554

López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, Moreira D. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. Nature. 2001; 409: 603-607

Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. Eukaryotic Cell. 2002; 1:495–502.

Lukes J, Jirku M, Dolezel D, Kral'ová I, Hollar L, Maslov DA. Analysis of Ribosomal RNA Genes Suggests That Trypanosomes Are Monophyletic. Journal of Molecular Evolution. 1997; 44:521-7.

Marande W, Lukeš J, Burger G. Unique mitochondrial genome structure in Diplomonads, the sister group of Kinetoplastids. Eukaryotic Cell. 2005; 4(6): 1137-1146

Marande W, Burger G. Mitochondrial DNA as a genomic jigsaw puzzle. Science. 2007; 318 (5849): 405-407

Marin B, Palm A, Klingberg M, Melkonian M. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and

synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*. 2003; 154(1):99-145.

Maslov DA, Yasuhira S, Simpson L. Phylogenetic affinities of Diplonema within the Euglenozoa as inferred from the SSU rRNA gene and partial COI protein sequences. *Protist*. 1999; 150 (1): 33-42

Maslov DA, Avila HA, Lake JA, Simpson L. Evolution of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Natura*. 1994; 368 (6469):345-348

Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of Leptomonas and Blastocrithidia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2001; 48(2):161-9.

Milanowski R, Kosmala S, Zakrys B, Kwiatowski J. Phylogeny of photosynthetic euglenophytes based on combined chloroplast and cytoplasmic SSU rDNA sequence analysis. 2006; 42 (3): 721-730.

Milanowski R, Zakrys B, Kwiatowski J. Phylogenetic analysis of chloroplast small-subunit rRNA genes of the genus Euglena Ehrenberg. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001; 51(Pt 3):773-81.

Montegut-Felkner AE, Triemer RE. Phylogenetic relationships of select Euglenoid genera based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*. 1997; 33: 512-519

Moreira D, von der Heyden S, Bass D, López-García P, Chao E, Cavalier-Smith T. Global eukaryote phylogeny: Combined small- and large-subunit ribosomal DNA trees support monophyly of Rhizaria, Retaria and Excavata. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007;44(1):255-66.

Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Sep;54(Pt 5):1861-75.

Moreira D, Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F. New insights into the phylogenetic position of diplomonads: G+C content bias, differences of evolutionary rate and a new environmental sequence. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 2001; 51: 2211–2219.

Mullet JE. Chloroplast development and gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1988; 39: 475-502

Müllner AN, Angeler DG, Samuel R, Linton EW, Triemer RE. Phylogenetic analysis of phagotrophic, photomorph and osmotrophic euglenoids by using the nuclear 18S rDNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; 51(3):783-91.

Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variability. *EMBNEW News*. 1997; 4: 14

Nozaki H. A new scenario of plastid evolution: plastid primary endosymbiosis before the divergence of the "Plantae," emended. *Journal of Plant Research*. 2005; 118(4):247-255

Nozaki H, Matsuzaki M, Takahara M, Misumi O, Kuroiwa H, Hasegawa M, Shin T, Kohara Y, Ogasawara N, Kuroiwa T. The phylogenetic position of red algae revealed by multiple nuclear genes from mitochondria-containing eukaryotes and an alternative hypothesis on the origin of plastids. *Journal of Molecular Evolution*. 2003 a;56(4):485-97.

Nozaki H, Ohta N, Matsuzaki M, Misumi O, Kuroiwa T. Phylogeny of plastids based on cladistic analysis of gene loss inferred from complete plastid genome sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 2003b; 57: 377-382.

Nudelman MA, Rossi MS, Conforti V, Triemer RE. Phylogeny of Euglenophyceae based on small subunit rDNA sequences: taxonomic implications. *Journal of Phycology*. 2003; 39: 226-235

Osafune T, Yokota A, Sumida S, Hase E. Immunogold localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with reference to pyrenoid morphology in chloroplasts of synchronized *Euglena gracilis* cells. *Plant Physiology*. 1990; 92:802–808.

Osaki LS e Czeko YMT. Genomic DNA cloning and related techniques. In: Genes and antigens of parasites, a laboratory manual. Morel CM, editor. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz. 1984; 165-185

Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Elhassam AM, El-Naeim, Kager PA. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene*. 1998; 92: 397-400

Preisfeld A, Berger S, Busse I, Liller S, Ruppel HG. Phylogenetic analyses of various euglenoid taxa (Euglenozoa) based on 18S rDNA sequence data. *Journal of Phycology*. 2000; 36: 220-226

Pringsheim EG. Contributions towards a monograph of the genus *Euglena*. *Nova Acta Leopoldina*. 1956; 125: 1-168

Pringsheim EG. Sea-water Euglenineae. *Archiv fur Mikrobiologie*. 1953; 18(2):149-64.

Pringsheim EG e Pringsheim O. Experimental elimination of chromatophores and eye spot in *Euglena gracilis*. *New Phytologist*. 1952; 51(1):65-76.

Pringsheim EG. Taxonomic problems in the Eugleninae. *Biological Reviews*. 1948; 23: 46-61

Rodriguez-Zavala JS, García-García JD, Ortiz-Cruz MA, Moreno-Sánchez R. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *Journal of Environmental Science Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 2007; 42(10): 1365-1378

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003; 19(12):1572-1574

- Ruiz LB, Rocchetta I, dos Santos Ferreira V, Conforti VTD. Isolation, culture and characterization of a new strain of *Euglena gracilis*. *Phycological Research*. 2004; 52 (2), 168-174.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSH Laboratory Press (2. ed.). 1989: 3
- Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(21):12111-12114
- Shin W e Triemer RE. Phylogenetic analysis of the genus *Euglena* (Euglenophyceae) with particular reference to the type species *Euglena viridis*. *Journal of Phycology*. 2004; 40: 759-771
- Stallwitz E, Hader DP. Effects of heavy metals on motility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*. *European Journal of Protistology*. 1994; 30:18–24
- Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006; 1:2688-2690.
- Simpson AG, Inagaki Y, Roger AJ. Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of "primitive" eukaryotes. *Molecular biology and evolution*. 2006; 23(3):615-25.
- Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 2004; 30:201–12.
- Simpson AG. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003; 53(Pt 6):1759-77.
- Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. 2002; *Molecular Biology and Evolution*. 2002 ;19(12):2071-83
- Simpson L, Theimann OH, Savill NJ, Alfonzo JD. Evolution of RNA editing in trypanosomes mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2000; 97:6986-93.
- Sittenfeld A, Vargas M, Sanchez E, Mora M, Serrano A. A new species of *Euglena* (Euglenozoa: Euglenales) isolated from extreme environments in "boiling mudflats" of Rincon de la Vieja volcano, Costa Rica]. *Revista de biologia tropical*. 2004; 52(1):27-30.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1986; 83(5): 1383-1387
- Sommer JR, Blum JJ. Cell division in *Astasia longa*. *Experimental Cell Research*. 1965; 39: 504-527
- Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006; 1:2688-2690.

Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008;15(3):226-32

Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advanced Parasitology*. 2001; 48:1-56.

Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. 1999; 118:107-16.

Sturm NR, Maslov DA, Grisard EC, Campbell DA. *Diplonema* spp. Possess spliced leader RNA genes similar to the Kinetoplastida. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2001; 48(3):325-31.

Sun GL, Shen W, Wen JF. Triosephosphate isomerase genes in two trophic modes of euglenoids (Euglenophyceae) and their phylogenetic analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2008; 55(3):170-177

Swofford DL. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and Other Methods). 1998. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates

Swofford DL, Olsen GJ, Wadell PJ, Hillis DM. Phylogenetic inference. In: Hillis, D. M.; Moritz, C.; Mable, B. K. (eds), *Molecular Systematics*, Sunderland, Massachusetts: Sinauer.

Talke S e Preisfeld A. Molecular evolution of Euglenozoan Paraxonemal rod genes *par1* and *par2* coincides with phylogenetic reconstruction based on small subunit rDNA data. *Journal of Phycology*. 2002; 38:995–1003.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 1997; 24: 4876-4882

Thompson MD, Copertino DW, Thompson E, Favreau MR, Hallick RB. Evidence for the late origin of introns in chloroplast genes from an evolutionary analysis of the genus *Euglena*. *Nucleic acids research*. 1995; 23(23):4745-52.

Triemer RE, Farmer MA. A decade of euglenoid molecular phylogenetics. In: Brodie J, Lewis J (eds). *Unravelling the Algae*. 2007; CRC press

Triemer RE, Linton E, Shin W, Nudelman A, Monfils A, Bennett M, Brosnan, S. Phylogeny of the Euglenales based upon combined SSU and LSU rDNA sequence comparisons and description of *Discoplastis* gen. nov. (Euglenophyta). *Journal of Phycology*. 2006; 42:731-740.

Vacula R, Sláviková S, Schwartzbach SD. Protein trafficking to the complex chloroplasts of *Euglena*. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 390: 219-237

Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumdsen, WHR, Evans DA (Eds.). *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press New York 1976; 1-34.

Von der Heyden S, Chao EE, Vickerman K, Cavalier-Smith T. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonid flagellates and the evolution of Euglenozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2004; 51: 402-416

Wehr JD e Sheath RG. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. 2003. Academic Press, San Diego.

Wolken, JJ. Euglena: The photoreceptor system for phototaxis. *Journal of Protozoology*. 1977; 24:518-522

Wright AD, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1999; 15; 99(1):69-76.

Xavier MB. Croptógramos do Parque Estadual das fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Algas*, 5: Euglenophyceae (Euglenaceae pigmentadas). *Hoehnea*. 1994; 2(1-2): 47-73

Yoon HS, Grant J, Tekle YI, Wu M, Chaon BC, Cole JC, Logsdon Jr JM, Patterson DJ, Bhattacharya D, Katz LA. Broadly sampled multigene trees of eukaryotes. *BCM Evolutionary Biology*. 2008; 8: 14

Zakrýs B. Contributions to the monograph of Polish members of the genus *Euglena* Ehrenberg 1830. *Nova Hedwigia*. 1986; 42: 491-540