



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
CURSO DE OCEANOGRAFIA

RAQUEL ALMEIDA BEZERRA RODRIGUES

**ESTUDO COMPARATIVO DE CIANOBACTÉRIAS SIMBIONTES EM COLÔNIAS
DE ASCÍDIAS DO ATLÂNTICO E PACÍFICO**

FORTALEZA

2013

RAQUEL ALMEIDA BEZERRA RODRIGUES

ESTUDO COMPARATIVO DE CIANOBACTÉRIAS SIMBIONTES EM COLÔNIAS
DE ASCÍDIAS DO ATLÂNTICO E PACÍFICO

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Oceanografia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Rui Simões de Menezes

R616e Rodrigues, Raquel Almeida Bezerra.

Estudo comparativo de cianobactérias simbiontes em colônias de Ascídias do Atlântico e Pacífico / Raquel Almeida Bezerra Rodrigues. – 2013.

26 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof. Dr. Tito Monteiro Lotufo da Cruz.

1. Ascídia. 2. Simbiose. I. Título.

CDD 596.2

RAQUEL ALMEIDA BEZERRA RODRIGUES

ESTUDO COMPARATIVO DE CIANOBACTÉRIAS SIMBIONTES EM COLÔNIAS
DE ASCÍDIAS DO ATLÂNTICO E PACÍFICO

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Oceanografia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia.

Aprovada em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dra. Oscarina Viana de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha filha, M^a Vitória.

Ao meu amor, Gildo.

Aos meus pais, Marcílio e Lúcia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tem me sustentado nesta caminhada; por Sua fidelidade e misericórdia que me alcançam todos os dias.

Sou grata a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho. Em especial, gostaria de agradecer:

Ao meu esposo, Gildo, pela paciência, carinho, amor e companheirismo de todos os dias. À minha filha, M^a Vitória, que me enche de energia a cada amanhecer com seu sorriso. AMO VOCÊS!

Aos meus pais, irmãos e familiares pela confiança depositada, pela constante presença, amor incondicional, compreensão e suporte, tão importantes nesta etapa da minha vida.

Ao professor Tito Lotufo pela oportunidade de trabalhar e aprender sob sua orientação, pela paciência e incentivo que recebi sempre que precisei.

À Andréa Oliveira por ter me ajudado em cada etapa da confecção deste trabalho. Por toda a atenção, paciência, compreensão, dedicação e amizade, muito obrigada!

A todos do Laboratório de Ecologia Animal, Caio, Sandra, Tatiana, Dayara, Ronaldo e em especial Eduardo, Amarílis, Nadia e Tarciana por toda ajuda, conselhos e conversas

Ao LABOMAR, pelas oportunidades concedidas durante todos os anos de graduação.

Aos meus amigos do curso de Oceanografia, responsáveis por grande parte do meu crescimento pessoal, especialmente Cibele, Fiamma, Daysiane, Carlos Alberto (41) e Gabriele, vão estar nas minhas melhores lembranças da faculdade.

Às amigas Tainara e Daisa, companheiras em todos os momentos, bons e ruins. Agradeço pelas conversas ou por simplesmente me ouvirem nas várias vezes que precisei falar. Obrigada por tudo, pela amizade, afeto e, é claro, por toda diversão também!

“É do buscar e não do achar que nasce o
que eu não conhecia.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

A simbiose de invertebrados marinhos com cianobactérias é bem documentada para muitos táxons, tais como Porifera e Ascidiacea. Esse tipo de interação nos Ascidiacea ocorre frequentemente com cianobactérias do gênero *Prochloron*. Vários estudos sobre essa interação foram desenvolvidos relatando os principais organismos hospedeiros e aspectos morfológicos e moleculares dos simbiosites. Contudo, a maioria desses estudos foi desenvolvido para organismos do Pacífico, sendo o Atlântico Sul uma lacuna, principalmente quanto à identidade molecular desses simbiosites. Diante disso, o objetivo deste estudo foi identificar o simbiote por meio da região do 16S rDNA e verificar sua afinidade filogenética. Para tal, espécimes de ascídias das espécies *Didemnum ligulum*, *Didemnum galacteum* e *Cystodytes* sp. com biofilme de microalgas visível foram coletadas. O biofilme foi lavado, examinado em microscopia ótica e em seguida foi feita a extração do DNA total. A partir do DNA extraído e purificado foram realizadas PCRs, sendo obtido um fragmento do gene 16S rDNA com 1.148 p.b. apenas para o simbiote da espécie *Cystodytes* sp. A sequência obtida nesse estudo apresentou uma similaridade de 98% com sequências de cianobactérias *Prochloron* depositadas no GenBank. A análise filogenética revelou que a sequência forma um clado bem suportado dentro de *Prochloron*. Apesar das diferentes localizações geográficas, a linhagem de *Prochloron* do Brasil (Atlântico Sul) parece não diferir das populações do Pacífico (Japão, Austrália, EUA) e Atlântico Norte (Panamá). Esse é o primeiro estudo que aborda a identificação da cianobactéria *Prochloron* em simbiose com a ascídia colonial *Cystodytes* sp., utilizando o método molecular e também o primeiro estudo para o Atlântico Sul.

Palavras-chaves: *Prochloron*, ascídia, simbiose

ABSTRACT

The symbiosis between marine invertebrates and cyanobacteria is well documented for many taxa, such as Porifera and Ascidiacea. Within the Ascidiacea this association often occurs with cyanobacteria from the genus *Prochloron*. Many studies have been conducted concerning the hosts and morphological and molecular aspects of the symbionts. Nevertheless, most of these studies were developed for organisms from the Pacific, while the South Atlantic is still ignored, especially as to the true identity of the symbionts. Therefore, the purpose of the present study was to identify the symbiont using 16S rDNA sequences, and also verify his phylogenetic affinity. In order to achieve these goals, specimens of ascidians from the species *Didemnum ligulum*, *Didemnum galacteum* and *Cystodytes* sp. with a visible biofilm were collected. The biofilm was washed, examined under optical microscopy and then total DNA was extracted. Using the purified DNA a 16S rDNA fragment with 1,148 b.p. was obtained through PCR for the species *Cystodytes* sp. The sequence showed 98% similarity with *Prochloron* sequences from the GenBank. The phylogenetic analysis revealed a well supported clade for *Prochloron* containing the Brazilian lineage. Despite the geographically distant locations, the Brazilian lineage seems not to differ from the Pacific (Japan, Australia, USA) or North Atlantic (Panama) ones. This is the first study concerning the identification of the cyanobacteria *Prochloron* in symbiosis with the colonial ascidian *Cystodytes* sp. using molecular tools, and also the first account for the South Atlantic.

Keywords: *Prochloron*, ascidian, symbiosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem de satélite da Praia do Náutico, Fortaleza-CE	15
Figura 2 - Células de <i>Prochloron</i> sp removidas da superfície externa das colônias de ascídia. Escala de 18 µm.	18
Figura 3 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança a partir de sequências do gene 16S rDNA da cianobactéria <i>Prochloron</i> sp. obtidas no Genbank (espécies hospedeira e local em parêntese) e a sequência obtida no estudo (em negrito).	22

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Resultado da comparação dos dados do GenBank com a sequência obtida pelo presente estudo, para o organismo simbiote da ascídia <i>Cystodytes</i> sp.	19
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO.....	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Coleta e fixação dos animais.....	15
3.2 Análises morfológicas dos simbiostes.....	16
3.3 Extração do DNA total e Purificação	16
3.4 Amplificação do DNA e Sequenciamento.....	16
3.5 Análise filogenética.....	17
4 RESULTADOS	18
4.1 Morfologia do simbiote	18
4.2 Sequência do 16S rDNA	18
4.3 Análise filogenética.....	21
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO.....	25

1 INTRODUÇÃO

As ascídias, como são conhecidos os organismos pertencentes à classe Ascidiacea, compreendem um grupo de invertebrados marinhos bentônicos que estão amplamente distribuídas nos oceanos, desde a região entremarés até grandes profundidades. Seus representantes constituem um grupo de animais sésseis, incrustantes e de hábito filtrador, alimentando-se de fitoplâncton e de partículas orgânicas presentes na água (RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998).

Esses organismos são encontrados na forma solitária, com um único indivíduo envolvido por uma túnica, e na forma colonial, com vários indivíduos, conhecidos como zoóides, envolvidos por uma túnica comum (MILLAR, 1971). As ascídias, assim como outros grupos de invertebrados marinhos, podem estabelecer associações com micro-organismos. No caso das ascídias esta interação se dá frequentemente com cianobactérias do gênero *Prochloron* (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991).

As *Prochloron* apresentam clorofila b e não possuem ficobilinas, características estas que as diferem da grande maioria das cianobactérias, como por exemplo *Synechocystis*, que formam um táxon irmão à linhagem das *Prochloron* e que também ocorrem em simbiose com ascídias (MÜNCHHOFF *et al.*, 2007).

As células de *Prochloron* podem ser encontradas na superfície externa da túnica da ascídia, embutidas na matriz da túnica, dentro da cavidade cloacal ou mesmo no interior das células das ascídias (COX, 1986; HIROSE *et al.*, 1996). As colônias de ascídias com simbiontes ocorrem em vários tipos de substratos, que podem ir de conchas a corais mortos. Durante a maré baixa estes organismos ficam expostos por várias horas (LEWIN; CHENG, 1989).

Estudos foram realizados na tentativa de se entender quais os reais benefícios reais tanto para o hospedeiro quanto para o simbiote neste tipo de interação. Sabe-se que a túnica do hospedeiro protege os simbiontes contra os raios ultravioleta e os simbiontes auxiliam o hospedeiro na fixação de carbono (DIONIOSIO-SESE *et al.*, 1997; DIONIOSIO-SESE, MARUYAMA; MIYACHI, 2001; HIROSE; MARUYAMA, 2004). Conhece-se ainda que a capacidade de metabolizar alguns compostos só ocorre em simbiose. Um exemplo disto é a atividade da nitrogenase exibida pela interação da *Prochloron* com a ascídia colonial *Lissoclinum patella* (PAERL, 1984).

Newcomb e Pugh (1975) foram os primeiros a registrarem essa interação com os simbioses embutidos em ascídias coloniais na Grande Barreira de Corais na Austrália. No mesmo ano foi registrada a simbiose de um procarionto fotossintético na superfície de ascídias coloniais nas áreas de recife de coral na costa mexicana, o qual foi denominado de *Synechocystis didemni* (LEWIN, 1975).

Lewin (1976) atribuiu esses micro-organismos a uma nova divisão das algas, Prochlorophyta. Mais tarde, criou-se o gênero *Prochloron* (LEWIN, 1977) para englobar todos os procariontes contendo clorofila *a* e *b* desprovidos de ficobilinas. Estudos moleculares, morfológicos e bioquímicos sugeriram Prochlorophyta como um grupo polifilético dentro da radiação de cianobactérias (SHIMADA; KANAI; MARUYAMA, 1995; LA ROCHE *et al.*, 1996), sendo então esta nova divisão inserida dentro de Cyanophyta (LEWIN, 2002).

A descoberta desta cianobactéria levou pesquisadores a acreditarem que as *Prochloron* teriam originado os cloroplastos (LEWIN, 1981) devido a sua composição pigmentar, contudo estudos moleculares demonstraram não haver relação entre o simbiote e a origem dos cloroplastos (PALENIK; HASELKORN, 1992).

Assim como a grande maioria dos micro-organismos, as *Prochloron* ainda não são cultivadas, porém deve-se ressaltar o sucesso parcial de manutenção de uma cultura que durou apenas 15 dias (PATTERSON; WITHERS, 1982). As chaves para a solução deste problema provavelmente incluem saldos corretos de osmolaridade, luz, oxigênio e CO₂, mas ainda não se foi capaz de acertar uma combinação adequada (LEWIN; CHENG, 1989)

Todos esses estudos citados foram realizados com simbioses do Pacífico, sendo o conhecimento para o Atlântico escasso. O conhecimento para o Atlântico se restringe à análise morfológica do simbiote, ou mesmo identificação das ascídias coloniais que servem como hospedeiros. Mais recentemente um estudo realizado para o Atlântico mostrou pela primeira vez a filogenia molecular das *Prochloron* com espécies oriundas do Atlântico Norte (Panamá) (HIROSE *et al.*, 2012). Os trabalhos sobre a simbiose (ascídia-*Prochloron*), para a ascídia colonial *Cystodytes* sp se restringem apenas a relatos de ocorrência.

Diante disso, o presente estudo pretende identificar por meio molecular se a cianobactéria encontrada na ascídia *Cystodytes* sp. pertence ao gênero *Prochloron*.

2 OBJETIVO

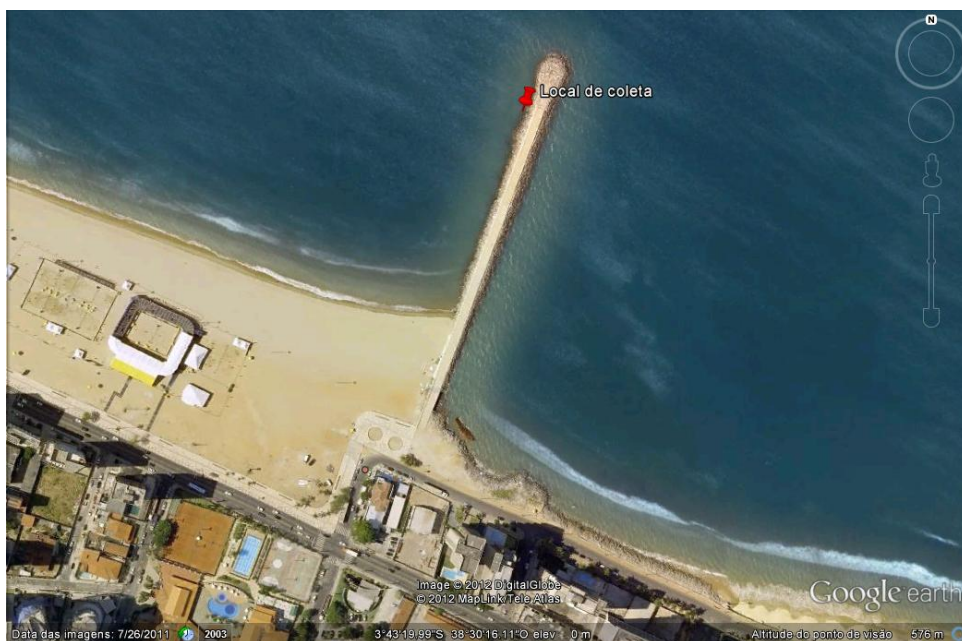
Identificar por meio da região 16S rDNA se o organismo simbiote na ascídia colonial *Cystodytes* sp. pertence ao gênero *Prochloron*, analisar as relações filogenéticas e inferir a biogeografia dos simbiotes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e fixação dos animais

As colônias de ascídias com simbiontes foram coletadas por mergulho livre na região do infralitoral, na praia do Náutico (03°43'18''S; 38°30'15''W) (FIGURA 1), localizada na região urbana de Fortaleza, em 05 de Julho de 2011. As amostras foram removidas cuidadosamente de seus substratos com o auxílio de uma espátula metálica, acondicionadas em sacos plásticos com água do mar e em seguida levadas ao Laboratório de Ecologia Animal do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (LECA – LABOMAR – UFC).

Figura 1 - Imagem de satélite da Praia do Náutico, Fortaleza-CE



Fonte: Google Earth (2012)

No laboratório, as amostras foram lavadas com água do mar filtrada e colocadas em uma placa de Petri estéril para a raspagem da superfície externa das colônias, com o auxílio de um bisturi estéril. O material resultante foi analisado por microscopia ótica e em seguida foi centrifugado para formação do *pellet*.

3.2 Análises morfológicas dos simbioses

As células foram observadas através de microscópio ótico da marca Olympus CH30, com ocular micrometrada onde foi possível fazer as medições das células. Suas formas foram registradas através de fotografias. A identificação e descrição morfológica destas células foram feitas de acordo com Hoek, Mann e Jahns (1995).

3.3 Extração do DNA total e Purificação

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *kit* DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante, com alteração no tempo de incubação, que foi de 12 h. Após a incubação houve a adição de 10 mg/ml de RNase e incubação a 37 °C por 15 min. O DNA total foi purificado utilizando o *kit* PowerClean® DNA *Clean-Up* (Mo Bio), para remoção de substâncias inibidoras da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguindo instruções do fabricante.

3.4 Amplificação do DNA e Sequenciamento

A amplificação da região do fragmento relativo ao 16S do rDNA foi feita por PCR utilizando os iniciadores (Invitrogen) 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1494R (TACGGCTACCTTGTTACGAC) (LANE et al., 1991). A PCR teve um volume final de 50 µl, contendo 25 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 10 pmol de cada primer, e 100 ng de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Bio-Rad C1000 programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 4 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 min, anelamento a 55°C durante 30 s, extensão a 72°C durante 1,5 min seguida de extensão final a 72°C por 7 min.

O produto de PCR foi observado em gel de agarose a 1% com tampão Tris-borato (TBE) e purificado utilizando o *kit* ExoSAP-IT® (USB Corporation) seguindo instruções do fabricante.

O sequenciamento foi realizado pela empresa MacroGen (<http://www.macrogen.com/>) através do sequenciador ABI 3730. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye™ – ABI PRISM, seguindo as instruções do fabricante.

3.5 Análise filogenética

Para a visualização dos eletroferogramas, alinhamento e obtenção da sequência consenso de DNA foi utilizado o programa Geneious Pro 5.5.6. Uma pesquisa usando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) possibilitou adicionar às análises filogenéticas sequências 16S rDNA de organismos mais estreitamente relacionados presente nos bancos de dados. O alinhamento das sequências foi realizado no MEGA 5. Inferências filogenéticas foram feitas através do Portal Cypres (<http://www.phylo.org/>) utilizando o programa RaxML-HPC Black Box com o modelo de substituição GTRGAMMA + I, para análise de máxima verossimilhança.

4 RESULTADOS

4.1 Morfologia do simbiote

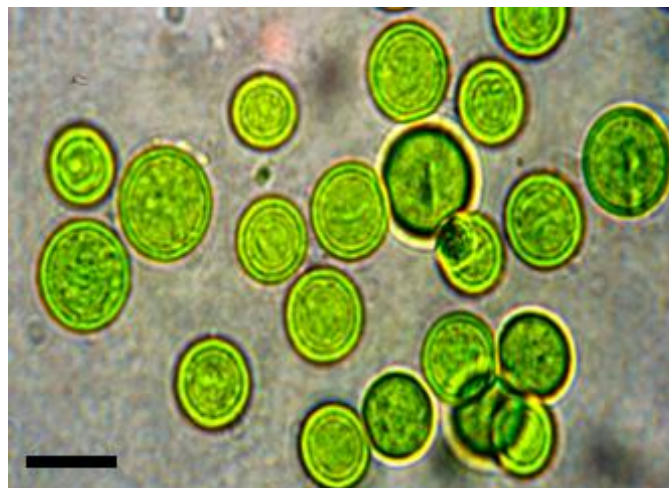
Divisão CYANOPHYTA

Classe CYANOPHYCEAE

Sub-Classe PROCHLOROPHYTA

Prochloron Lewin, 1975

Figura 2 - Células de *Prochloron* sp removidas da superfície externa das colônias de ascídia. Escala de 18 μm .



Descrição:

Células unicelulares, solitárias, encontram-se na forma esférica, de cor esverdeada, com diâmetro medindo de 12 μm a 18 μm (FIGURA 2). Apresentam pequenos vacúolos na região central da célula e tilacóides poucos expandidos nas extremidades da parede celular.

4.2 Sequência do 16S rDNA

A sequência obtida nesse estudo é a primeira sequência de *Prochloron* para um hospedeiro da família Polycitoridae e apresenta 1.148 pb. Quando comparada por meio do mecanismo de busca no National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mostrou uma similaridade de 98% com sequências do gênero *Prochloron* para o mesmo gene (TABELA 1).

Tabela 1 – Resultado da comparação dos dados do GenBank com a sequência obtida pelo presente estudo, para o organismo simbiote da ascídia *Cystodytes* sp.

Dados GenBank	Hospedeiro	Localização	Similaridade %
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone LI-88 (DQ357969)	<i>Trididemnum</i> <i>paracyclops</i>	Austrália	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone AO-100 (DQ357955)	<i>Trididemnum</i> <i>cyclops</i>	Japão	98%
<i>Prochloron</i> sp (X63141).	<i>Lissoclinum</i> <i>patella</i>	Palau	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone HI-10 (DQ357950)	<i>Lissoclinum</i> <i>patella</i>	Austrália	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone HA-96 (DQ357967)	<i>Trididemnum</i> <i>miniatum</i>	Japão	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone BO136 (DQ385852)	<i>Trididemnum</i> <i>miniatum</i>	Japão	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone HI-5 (DQ357951)	cf. <i>Lissoclinum</i> <i>triangulum</i>	Austrália	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. (AB723721)	<i>Diplosoma simile</i>	Panamá	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone AO-101 (DQ357968)	<i>Lissoclinum</i> sp.	Japão	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone NA-107 (DQ357966)	<i>Diplosoma simile</i>	Japão	98%

Tabela 1-Continuação. Resultado da comparação dos dados do GenBank com a sequência obtida pelo presente estudo, para o organismo simbiote da ascídia *Cystodytes* sp.

Dados GenBank	Hospedeiro	Localização	Similaridade %
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone HW-6 (DQ357949)	<i>Diplosoma simile</i>	Haváí	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone HI-7 (DQ357948)	Genero desconhecido	Austrália	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone NA-110 (DQ357960)	<i>Diplosoma ooru</i>	Japão	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone AK-122 (DQ357953)	<i>Lissoclinum</i> <i>bistratum</i>	Japão	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone LI-85 (DQ357963)	<i>Diplosoma virens</i>	Austrália	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. (AB723720)	<i>Diplosoma simile</i>	Panamá	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone AO-104 (DQ357957)	<i>Diplosoma</i> <i>simileguwa</i>	Japão	98%
Uncultured <i>Prochloron</i> sp. clone TA-113 (DQ357962)	<i>Diplosoma virens</i>	Japão	98%

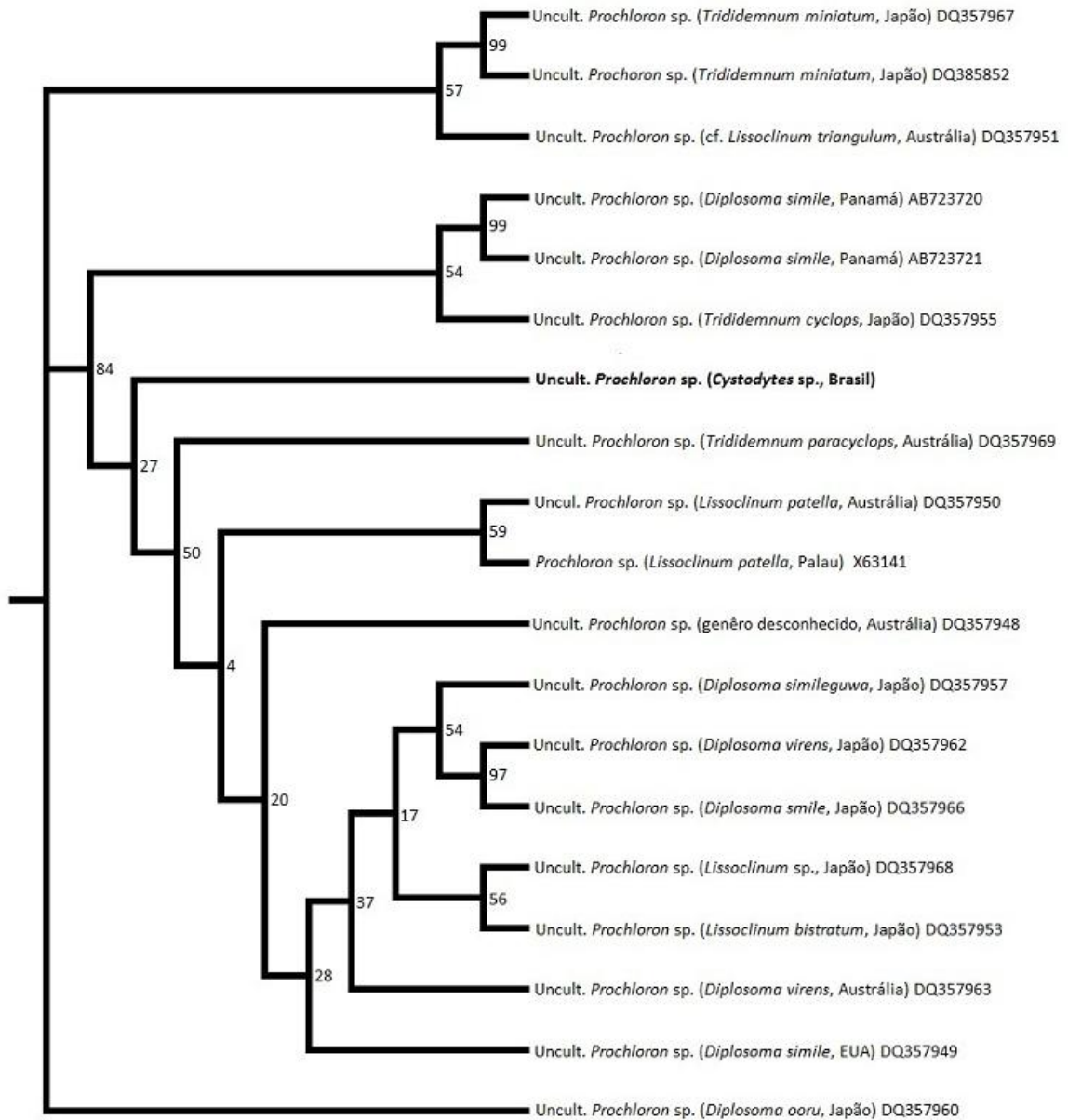
Abaixo a sequência obtida no presente estudo:

GCAGTCGACGAACTCTTTGGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGA
 ATCTACCTCAAGGACGGGGACAACAGCAGGAACTGGTGCTWATACCCGATAG
 CGCTGAAAAGTGAAAGATTAATTACCTAGAGAGGAGCTCGCGTCCGATTAGCTA
 GTTGGAAGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGA
 TGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAG
 GGAAGAAGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTGTTCAGGGAAGAAGAAATGACGG
 TACCTGAAGAAAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
 AGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCGA
 ATAAAGTCTGCTGTTAAAGACCGGGGCTAAACTCCGGAAAGGCAGTGGAAACTG
 ATTGGCTAGAGTACGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTAGGCCGAAACT
 GACTGAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGT
 CTTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGCTTGTATCGACCCRAGCTGTGCC
 GAAGCTAACGCGATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCG
 ATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTTCGCGAATCTAGCTGAAAG
 GTTAGAGTGCCTTAGGGAACGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT
 CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTA
 GTTGCCAGTATTAAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGGGACAACCTCGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCGACACAC
 GTACTACAATGGTTGGGACAAAGGGCAGCAA

4.3 Análise filogenética

Com base no alinhamento das sequências de 16S rDNA obteve-se uma árvore filogenética pelo método de máxima verossimilhança (FIGURA 3), baseada em 1.152 posições de nucleotídeos. Essa análise filogenética revelou que a sequência do fotosimbionte da ascídia *Cystodytes* sp. do Ceará forma um clado bem suportado no qual agrupam-se a maioria das sequências de *Prochloron* obtidas de ascídias do Pacífico (EUA, Japão e Austrália) e também do Atlântico Norte (Panamá).

Figura 3 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança a partir de sequências do gene 16S rDNA da cianobactéria *Prochloron* sp. obtidas no Genbank (espécie hospedeira e local em parênteses) e a sequência obtida no estudo (em negrito).



5 DISCUSSÃO

Até este estudo não havia sido registrada a ocorrência das células de *Prochloron* em simbiose com ascídias coloniais para o Atlântico Sul. Esse é o primeiro trabalho que aborda a identificação da cianobactéria *Prochloron* em simbiose com a ascídia colonial *Cystodytes* sp., utilizando o método molecular.

As *Prochloron* são classificadas em três grupos: no primeiro as células ocorrem na superfície da túnica da ascídia e possuem pequenos vacúolos (Tipo I), no segundo encontram-se na cavidade cloacal e tem grandes vacúolos centrais (Tipo II) e o terceiro grupo é o dos simbiosites da ascídia *Didemnum molle* que são caracterizados por pouca 'vacuolização' e muitas inclusões granulares (Tipo III; COX, 1986). As células de *Prochloron* deste estudo foram encontradas na superfície da colônia *Cystodytes* sp. e correspondem ao Tipo I. Neste tipo de interação os fotosimbiontes são adquiridos do ambiente por meio do processo de transmissão horizontal, indicando ser uma simbiose facultativa.

Apesar dos relatos da ocorrência de células que são ultraestruturalmente distinguíveis (NEWCOMB e PUGH, 1975; COX, 1986), o que sugere a existência de diferentes espécies de *Prochloron*, os resultados obtidos revelam uma oposição entre os dados morfológicos e moleculares, pois as amostras analisadas pela comparação do gene 16S rDNA mostraram uma estreita relação filogenética entre as sequências, independente do hospedeiro, localização geográfica (Japão, EUA, Austrália, Panamá e Brasil) e local de incubação das células. Esse resultado corrobora com o estudo de Munchhoff *et al.* (2007), para sequências do Pacífico e de Hirose *et al.* (2012), para sequências do Panamá.

Contudo, não se sabe se as *Prochloron* consistem de várias espécies ou de uma única espécie (HIROSE *et al.*, 2012). Uma possível explicação para este fato é que o gene 16S rDNA, por ser altamente conservado, apresenta poucas mutações, resultando em grande similaridade entre as sequências analisadas. Esse gene apresenta uma alta identidade de nucleotídeos, onde a definição de mesma espécie por meio de análise molecular é confirmada com similaridade de 99 a 97% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

A árvore filogenética das *Prochloron* baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA mostrou que a não especificidade desse micro-organismo para as espécies de hospedeiro também ocorre para ascídias de diferentes famílias.

Salienta-se que tal fato pode estar relacionado à transmissão horizontal das células de *Prochloron* para o hospedeiro, ou ainda a uma linhagem muito jovem, para a qual não tenha ocorrido ainda divergência (PALENIK e SWIFT, 1996).

A alta similaridade das sequências de *Prochloron*, ou seja, a baixa variabilidade genética sugere uma possível existência de formas de vida-livre, o que explicaria a sua distribuição, mas ainda existem controvérsias quanto a esse assunto.

Há relatos da ocorrência dessas cianobactérias em água do mar nos recifes da Grande Barreira de Corais, na Austrália e a existência de células de *Prochloron* em estromatólitos (COX, 1986; BURNS *et al.*, 2004). Acredita-se que as *Prochloron* consigam sobreviver fora do seu hospedeiro por tempo suficiente para atravessar distâncias consideráveis antes de recolonizar outro hospedeiro (MUNCHHOFF *et al.*, 2007).

Essa simbiose (ascídia-*Prochloron*) pode ter tido sua origem na região tropical do Indo-Pacífico e depois introduzida no Caribe, provavelmente antes do surgimento do Istmo do Panamá ou ainda uma origem mais recente pode ser atribuída ao transporte marítimo através do Canal do Panamá (HIROSE *et al.*, 2012).

Sugere-se que novos estudos sejam realizados utilizando outros genes, para que se possa tentar distinguir essas cianobactérias em um nível intra-específico. Dessa forma será possível ter um melhor conhecimento da diversidade genética das *Prochloron*.

6 CONCLUSÃO

O organismo simbiote na ascídia colonial *Cystodytes* sp. identificado por meio da região 16S rDNA pertence ao gênero *Prochloron*.

Apesar das diferentes localizações geográficas, a população de *Prochloron* encontrada em simbiose com ascídias do Brasil (Atlântico Sul) parece não diferir das populações do Pacífico (Japão, Austrália, EUA) e Atlântico Norte (Panamá).

REFERÊNCIAS

- BURNS, B.P. *et al.* Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. **Environ Microbiol** 6: 1096–1101. 2004.
- COX, G. C. Comparison of *Prochloron* from Different Hosts. I. Structural and Ultrastructural Characteristics. **New Phytol.**, v.104, p.429–445. 1986.
- DIONISIO-SESE, M. L. UV-absorbing substances in the tunic of a colonial ascidian protect its symbiont, *Prochloron* sp., from damage by UV-B radiation. **Marine Biology**, v. 128, p.455-461, 1997.
- DIONISIO-SESE, M. L.; MARUYAMA, T.; MIYACHI, S. Photosynthesis of *Prochloron* sp. Affected by Environmental Factors. **Marine Biotechnology**, Japan, n. , p.74-79, 2001.
- HIROSE, E. *et al.* Intracellular symbiosis of a photosynthetic prokaryote, *Prochloron* sp., in a colonial ascidian. **Invertebrate Biology**, v.115, p. 343-348. 1996.
- HIROSE, E. MARUYAMA, T. What are the benefits in the ascidian-*Prochloron* symbiosis? **Endocytobiosis cell res.**, v.15, p.51-62. 2004.
- HIROSE, E. *et al.* First records of didemnid ascidians harbouring *Prochloron* from Caribbean Panama: genetic relationships between Caribbean and Pacific photosymbionts and host ascidians. **Systematics and Biodiversity**. 1-11. 2012.
- HOEK, C.; MANN, D. G. JAHNS, H. M., **Algae: An Introduction a Phycology** ed.: Cambridge: Cambridge University, 1995. 627p.
- LANE, D. J. *et al.* 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E.Stackebrandt & M. Goodfellow. New York: Wiley. 1991
- LA ROCHE, J. *et al.* Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll a/b light-harvesting proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 93: 15244–15248. 1996
- LEWIN, R A.; CHENG, L. **Prochloron: a microbial enigma**. New York: Chapman and Hall, 1989.
- LEWIN, R. A. A marine *Synechocystis* (cyanophyta chroococcales) epizoic on ascidians. **Phycologia**, v.14, p.153-160. 1975.
- LEWIN, R. A. Prochlorophyta - a matter of class distinctions. **Photosynthesis Research**, v.73, p.59 - 61 2002.
- LEWIN, R. A. Prochlorophyta as a Proposed New Division of Algae. **Nature**, v.261, p.697-698. 1976.
- LEWIN, R.A. *Prochloron*-type genus of the Prochlorophyta. **Phycologia**. 16: 217. 1977.

LEWIN, R. A. *Prochloron* and the theory of symbiogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 361: 325–329. 1981.

MILLAR, R. H., **The Biology of Ascidian**. Advances in Marine Biology, 1971 v.9, p.1-100.

MONNIOT, C.; MONNIOT, F. LABOUTE, P. Coral Reef Ascidians of New Caledonia. **Collections Faune Tropicale, N° XXX, ORSTOM Editions, Paris.**, p.247. 1991.

MUNCHHOFF, J. *et al.* Host specificity and phylogeography of the prochlorophyte *Prochloron* sp., an obligate symbiont in didemnid ascidians. **Environmental Microbiology**, v.9, n.4, p.890-899. 2007.

NEWCOMB, E. H. PUGH, T. D. Blue – green algae associated with ascidians of the Great Barrier Reef. **Nature**, v.253, p.533-534. 1975.

PAERL, H. W. N₂ fixation (nitrogenase activity) attributable to a specific *Prochloron* (Prochlorophyta)-ascidian association in Palau, Micronesia. **Marine Biology**, v. 81, p.251-254, 1984.

PALENIK, B. HASELKORN, R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b- containing prokaryotes. **Nature**, v.355, p.265 - 267. 1992.

PALENIK, B.; SWIFT, H. (1996) Cyanobacterial evolution and Prochlorophyte diversity as seen in DNA-dependent RNA polymerase gene sequences. **J Phycol** 32: 638–646.

PATTERSON, G. M. L. WITHERS, N. W. Laboratory Cultivation of *Prochloron* , a Tryptophan Auxotroph. **Science**, v.217, p.1034 - 1035. 1982.

RODRIGUES, S. A.; ROCHA, R. M.; LOTUFO, T. M. C. **Guia ilustrado para identificação das ascídias do Estado de São Paulo**. São Paulo: Parma, 1998. 190p.

SHIMADA, A.; KANAI, S.; MARUYAMA, T. Partial sequence of Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase/ Oxygenase and the phylogeny of *Prochloron* and Prochlorococcus (Prochlorales). **J Mol Evol** 40: 671–677.1995.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int J Syst Bacteriol** 44: 846–849. 1994.