

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
PESCA**

**Filogenia molecular de Tunicata com  
ênfase em Ascidiacea**

DANIELE PEQUENO LOPES

FORTALEZA- CEARÁ-BRASIL

ABRIL/ 2006

# FILOGENIA MOLECULAR DE TUNICATA COM ÊNFASE EM ASCIDIACEA

DANIELE PEQUENO LOPES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ , COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PESCA.

FORTALEZA- CEARÁ-BRASIL

ABRIL/ 2006

DANIELE PEQUENO LOPES

Filogenia molecular de Tunicata com ênfase em Ascidiacea

Fortaleza, 20 de abril de 2006.

---

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo (Orientador)  
Departamento de Engenharia de Pesca, UFC

---

Prof. Dr. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto  
Departamento de Engenharia de Pesca, UFC

---

Prof. Dra. Rosana Moreira da Rocha  
Departamento de Zoologia, UFPR

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Lívio Moreira de Gurjão pela ajuda nas coletas, na dissecação do material, por compartilhar comigo todas as alegrias e frustrações que tive durante a execução desta dissertação e por ter sido uma pessoa que durante estes dois anos de mestrado foi tudo pra mim, passando de namorado a marido, sem nunca deixar de ser o meu melhor amigo e companheiro constante de todas as horas.

Agradeço também aos meus pais e irmã, por terem me apoiado durante toda a minha vida acadêmica e por estarem sempre torcendo por mim e pela minha felicidade, seja onde for.

Ao meu orientador Tito Monteiro da Cruz Lotufo, inicialmente, por ter me aceito com sua primeira orientanda de mestrado (que responsabilidade a minha!), por me ensinar mais sobre estes fantásticos organismos, que são as ascídias, por sempre se mostrar prestativo, me ajudando em tudo, desde uma carta de recomendação às dúvidas a cerca do projeto. Agradeço por ter sido um orientador presente, sempre proporcionando discussões e sugestões ao trabalho e “embarcando” de cabeça e coração nos projetos fossem eles de filogenia ou genética de populações.

Ao professor Thalles Barbosa Granjeiro que mesmo não sendo um profundo conhecedor dos animais sempre se fascinou pelos trabalhos com os mesmos, abrindo as portas do laboratório de genética para que trabalhos envolvendo a biologia molecular pudessem ser realizados.

Ao professor Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto por ter aceitado participar da minha banca, pelas cartas de recomendação e ter confiado que eu voltaria daquele lugarzinho perdido no fim do mundo para concluir o mestrado.

À professora Rosana Moreira da Rocha por ter aceitado viajar de tão longe para participar da banca de mestrado e engrandecer o trabalho com suas considerações.

Ao amigo Daniel Macedo por sempre se mostrar um parceiro, tanto de laboratório quanto de sonhos, por ter me ajudado na edição da seqüência consenso final e construção das árvores filogenéticas de máxima parcimônia.

Aos amigos e professores do curso de Pós-graduação em Engenharia de Pesca pelo convívio e ensinamentos que tive durante o curso de mestrado.

À Rogéria por sempre se mostrar solícita as necessidades burocráticas sempre tão presentes no meio público.

A todos os amigos do laboratório de Citogenética e Genética Molecular Prof. Valdinar Custódio, por formarem um ambiente de trabalho único, alegre e cooperativo, onde não há lugar para competições e rivalidades, sempre tão comuns em diversos laboratórios.

Aos amigos sempre presentes Ana Carolina, Arihana Marreiro, Carlos Augusto Oliveira de Meireles, Sula Salani e Tatiane Martins, que desde a graduação me proporcionam momentos de amizade e alegria.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1- Introdução .....	13
1.1- Filo Chordata Balfour, 1880 .....	13
1.2- Tunicata .....	17
1.3- Thaliacea.....	20
1.4- Appendicularia ou Larvacea.....	21
1.5- Ascidiacea.....	23
1.6- Utilização da seqüência de <i>Microcosmus exasperatus</i> na reconstrução da história filogenética dos Ascidiacea.....	30
1.7 - Biologia molecular .....	31
1.7.1- DNA ribossômico nuclear (nrDNA).....	33
1.8 - Mudanças na seqüência de DNA.....	37
1.9 - Sistemática filogenética.....	38
1.10- Filogenia molecular .....	41
1.11- Bioinformática .....	42
2- Objetivos .....	54
3- Materiais e Métodos.....	55
3.1. Coleta dos animais.....	55
3.2. Isolamento do DNA genômico.....	55
3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose a pH neutro .....	57
3.4. Amplificação da região 18S do nrDNA, por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).....	58
3.5. Reação de sequenciamento.....	61
3.6. Montagem das seqüências consenso .....	62
3.7. Busca em bancos de dados públicos .....	62
3.8. Alinhamento múltiplo das seqüências. ....	63
3.9. Edição dos alinhamentos por meio do programa BioEdit.....	97
3.10. Verificação da qualidade do sinal filogenético e o teste do modelo de substituição nucleotídica .....	67
3.11. Construção das árvores filogenéticas.....	68
4- Resultados .....	69
4.1- Extração de DNA genômico .....	69
4.2- Amplificação da região 18S do nrDNA de <i>Microcosmus exasperatus</i> ...	70
4.3- Alinhamento múltiplo de seqüências.....	70
4.4- Saturação das substituições de bases.....	71
4.5- Análises de agrupamento e as matrizes de distância .....	72
4.6- Cladogramas.....	74
5- Discussão.....	93
5.1- DNA genômico .....	93
5.2- Região 18S.....	94
5.3- Saturação de bases e modelo de substituição nucleotídica.....	95
5.4- Filogenias moleculares .....	96
5.5- Relações filogenéticas de Chordata + Ambulacraria.....	98

5.6- Relações filogenéticas dos Chordata.....	99
5.7- Relações filogenéticas dos Tunicata.....	101
5.8- Relações filogenéticas dos Ascidiacea.....	103
6- Conclusões .....	110
6- Referências Bibliográficas.....	111
ANEXO 1.....	123
ANEXO 2.....	131

## RESUMO

Por muitos anos a filogenia de muitos grupos animais permaneceu obscura para os zoólogos, pois o uso de marcadores morfológicos muitas vezes leva a um resultado insatisfatório. A partir do advento de técnicas moleculares, as relações de parentesco de diversos táxons puderam ser analisadas, quationando visões filogenéticas anteriores baseadas em dados fisiológicos, morfológicos, de registro fóssil entre outros.

Desse modo, ocorreu um grande desenvolvimento da produção científica que envolvia o estudo da filogenia dos mais diversos grupos, entre eles, Tunicata e Ascidiacea. Apesar da existência de diversos trabalhos que propõem uma análise das relações de parentesco de tais táxons, ainda há dados bastante conflitantes que não levam a um resultado final esclarecedor.

O presente trabalho teve como objetivo compreender melhor a filogenia de Tunicata, com ênfase nos Ascidiacea, utilizando a análise da região 18S do nrDNA de *Microcosmus exasperatus*, que foi obtido mediante extração baseada no reagente CTAB, e de outras espécies cujas sequências encontravam-se disponíveis no GenBank. Para obtenção da seqüência alvo, as reações de PCR foram realizadas utilizando iniciadores universais que flanquearam tal região, sendo obtida uma seqüência consenso que foi utilizada para a construção dos cladogramas.

A partir das análises dos cladogramas gerados foi possível obter indicações de que Chordata e seus subfilos são monofiléticos. Quanto aos representantes de Tunicata, Appendicularia ficou caracterizado como o grupo mais basal. Não foi possível a confirmação da divisão do grupo Ascidiacea em duas ordens: Pleurogona e Enterogona. Contudo, Phlebobranchia, Aplousobranchia e Stolidobranchia foram confirmados para a maioria das árvores. Appendicularia foi considerado monofilético, enquanto Ascidiacea e Thaliacea foram identificados como parafiléticos, sendo que este último mostrou-se próximo das ascídias flebobranquias. Com relação a Stolidobranquia, seu monofiletismo foi demonstrado em grande parte dos cladogramas obtidos, apresentando Molgulidae como um grupo monofilético mais basal. Os Phlebobranchia configuraram um clado monofilético, incluindo a família Cionidae como um dos seus representantes.

## ABSTRACT

Phylogenetic relationships among many animal groups have been considered unclear by zoologists for many years, as morphological markers sometimes led to unsatisfactory results. The development of molecular techniques allowed the understanding of evolutionary relationships of many taxa, questioning previous phylogenetic reconstructions based on physiological and morphological aspects, fossil records, and other sources of data.

As a result, there was a great development of scientific production regarding phylogenetic studies of distinct groups, including Tunicata and Ascidiacea. Despite the many works proposing hypothesis about relationships between those taxa, there are many conflicting data.

The aim of the present work is to review the phylogeny of Tunicata, focusing on the taxon Ascidiacea, by analyzing the 18S nrDNA region of *Microcosmus exasperatus*, which was obtained through extraction based on CTAB reagent, along with other species whose sequences were available on GenBank. In order to achieve the desired target sequence, PCR reactions using universal primers that matched that region were performed and the consensus sequence obtained was compared to other sequences to produce phylogenetic trees.

The analysis of the cladograms obtained indicated that Chordata and its subphyla are indeed monophyletic. Regarding the Tunicata, Appendicularia was identified as the most basal group. It was not possible to confirm the division of Ascidiacea into two distinct orders: Pleurogona and Enterogona. However, Phlebobranchia, Aplousobranchia and Stolidobranchia were present in most of the trees. Appendicularia was considered monophyletic, and Ascidiacea and Thaliacea were identified as paraphyletic groups, where the latter presented a close relationship with phlebobranch ascidians. Stolidobranchia appeared as a monophyletic group in most of the cladograms, showing Molgulidae also as monophyletic in a basal position. Phlebobranchia is also monophyletic and included the family Cionidae as one of its representatives.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética dos Deuterostomata segundo TUBERVILLE et al. (1994).	15
Figura 2- Hipóteses das relações de parentesco entre os deuterostômios, a partir de TUBERVILLE et al. (1994).	16
Figura 3- Cladograma indicando as ordens presentes em Thaliacea (ZENG & SWALLA, 2005).	21
Figura 4- Hierarquia dos táxons em Ascidiacea. Fonte: MONNIOT et al. (1991).	25
Figura 5 - Resumo esquemático da classificação de Ascidiacea segundo Monniot et al. (1991).	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 6 – Aspecto externo de <i>Microcosmus exaspetaus</i> .	30
Figura 7- Representação esquemática do nrDNA. ETS, NTS e ITS Fonte: MATIOLI, 2001.	34
Figura 8 – Representação de uma árvore filogenética com as indicações de ramos, nós internos e externos e OTUs (referentes aos números 1, 2, 3, 4 e 5).	39
Figura 9- Representação de uma árvore enraizada (A) e não enraizada (B)...	40
Figura 10- Alinhamento múltiplo das seqüências de representantes de Tunicata por meio do programa ClustalX.	46
Figura 11- Edição do alinhamento múltiplo realizado para as seqüências de Tunicata por meio do programa BioEdit.	48
Figura 12- Eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo EtBr a 0,5µg/ml, visualizado em luz UV. M- marcador de alto peso molecular; 1- 0,3 gramas do lado direito do animal; 2- 0,2 gramas do lado direito do animal; 3- 0,1 grama do lado direito do animal; 4- 0,3 gramas do animal inteiro; 5- 0,2 gramas do animal inteiro; 6- 0,1 grama do animal inteiro.	69
Figura 13- Eletroforese em gel de agarose 1% contendo EtBr a 0,5µg/ml, visualizado em luz UV. Poço 1: marcador de baixo peso molecular; Poços 2, 5 e 8: primeiro segmento do 18S (nrDNA); Poços 3, 6 e 9: segundo segmento do 18S (nrDNA); Poços 4, 7 e 10: terceiro segmento do 18S (nrDNA).	70
Figura 14- Gráfico da taxa de transições ( <b>XS</b> ) e transversões ( <b>DV</b> ) versus a divergência das seqüências utilizando o modelo de Tamura-Nei (1993), para os dados provenientes da região do nrDNA 18S.	72
Figura 15- Cladograma obtido pelo método <i>Neighbor-joining</i> para os deuterostômios estudados. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de <i>bootstrap</i> (1000 replicações).	76
Figura 16- Cladograma obtido pelo método UPGMA para os deuterostômios estudados. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de <i>bootstrap</i> (1000 replicações).	77
Figura 17- Cladograma obtido pelo método da máxima parcimônia para os deuterostômios estudados.	78
Figura 18- Cladograma obtido pelo método do <i>neighbor-joining</i> para os deuterostômios estudados, com <i>Holothuria impatiens</i> como grupo externo.	79

Figura 19- Cladograma obtido pelo método UPGMA para os deuterostômios estudados, com <i>Holothuria impatiens</i> como grupo externo. ....	80
Figura 20- Cladograma obtido pelo método da máxima parcimônia para os deuterostômios estudados, com <i>Holothuria impatiens</i> como grupo externo. ....	81
Figura 21- Árvores filogenéticas propostas para Ambulacraria + Chordata. <b>A</b> - método do Viziinho Próximo; <b>B</b> - método UPGMA; <b>C</b> - método da Máxima Parcimônia.....	82
Figura 22- Cladograma dos Chordata obtido pelo método do <i>neighbor-joining</i> (VP).....	83
Figura 23 – Cladograma dos Chordata obtido pelo método UPGMA. ....	84
Figura 24- Cladograma dos Chordata obtido pelo método da máxima parcimônia. ....	85
Figura 25- Cladograma para os Tunicata obtido pelo método do <i>neighbor-joining</i> ( <i>Neighbor joining</i> ). ....	86
Figura 26- Cladograma para os Tunicata obtido pelo método UPGMA.....	87
Figura 27- Cladograma para os Tunicata obtido pelo método da máxima parcimônia. ....	88
Figura 28- Cladograma obtido para os Ascidiacea pelo método do <i>neighbor-joining</i> (VP). ....	89
Figura 29- Cladograma obtido para os Ascidiacea pelo método UPGMA. ....	90
Figura 30- Cladograma obtido para os Ascidiacea pelo método da máxima parcimônia. ....	91
Figura 31- Árvores filogenéticas propostas para Ascidiaceaa. <b>A</b> - método do Viziinho Próximo; <b>B</b> - método UPGMA; <b>C</b> - método da Máxima Parcimônia. ....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região-alvo. ....	60
Tabela 2- Constituintes e volumes utilizados na preparação da mistura. ....	61
Tabela 3- Condições de amplificação da região 18S. ....	61
Tabela 4- Condições da reação de sequenciamento. ....	62
Tabela 5- Espécies que tiveram suas seqüências 18S copiadas do GenBank com seu respectivo número de acesso no referido banco de dados e classificação. ....	64
Tabela 6- Táxons analisados no trabalho indicando sua composição nucleotídica e o comprimento final das seqüências, após alinhamento e edição das mesmas (T = timina, C = citosina, A = adenina G = guanina). ....	73
Tabela 7- Valores de distribuição gama empregados para os conjuntos de dados. ....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
°C	Graus Celsius
CTAB	Brometo de cetiltriethylamônio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
G	Guanina
ng	Nanogramas
NaCl	Cloreto de Sódio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
T	Timina
Taq DNA polimerase	DNA polimerasae de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris-Ácido bórico 45mM, EDTA 1mM, pH8,0
TE	Tampão Tris-HCl 100mM, EDTA 1mM, pH 8,0
Tris	Tris-hidróxiaminometano

# **1- Introdução**

## **1.1- Filo Chordata Balfour, 1880**

O filo Chordata agrupa animais que em algum período do seu ciclo de vida apresentam quatro sinapomorfias características: presença de notocorda, tubo nervoso dorsal, endóstilo e cauda pós anal. Tal filo é composto dos subfilos Tunicata, também denominado Urochordata, Cephalochordata e Vertebrata, sendo os dois primeiros táxons compostos por invertebrados exclusivamente marinhos que ocorrem em todos os oceanos e são denominados conjuntamente como protocordados.

Estudos filogenéticos baseados em análises de DNA (ácido desoxiribonucléico) já apresentaram evidências da monofilia de Chordata (CAMERON et al., 2000). Contudo, as relações de parentesco dentro do filo ainda são incertas, pois há pesquisadores, apoiados em dados moleculares e morfológicos, que indicam maior proximidade entre os táxons Tunicata e Vertebrata (BLAIR & HEDGES, 2005) e há aqueles que sugerem a formação do clado Cephalochordata + Vertebrata (WADA, 1998), que de acordo com ZENG & SWALLA (2005) seria a hipótese filogenética mais correta, pois os dois táxons apresentam estilo de vida solitário, um contraste com a característica colonial presente em muitos tunicados.

Outro táxon que inicialmente era agrupado dentro de Chordata é Hemichordata, sendo tradicionalmente incluído entre os protocordados. Acreditava-se que os hemicordados tinham seu desenvolvimento suficientemente parecido com os cordados, de forma que poderiam ser enquadrados dentro do mesmo filo (LAMBERT, 2005a). No entanto, este grupo apresentava ainda uma outra hipótese quanto às suas relações de parentesco,

a qual se baseava na aparência das larvas dos mesmos, que indicava que há muitas similaridades entre estes e Echinodermata, tendo sido reunidos por Metschnikoff em 1869 em um grupo comum denominado Ambulacraria (CAMERON, 2005).

Apesar da controvérsia quanto ao parentesco de Hemichordata (CASTRESANA et al., 1998), quando a homologia da notocorda e a estrutura semelhante que estes organismos apresentam foram questionadas, este grupo foi então retirado de Chordata passando a ser considerado como um filo à parte (BRUSCA & BRUSCA, 2002).

Estudos recentes, baseados em dados moleculares, atestam que Hemichordata não é tão proximamente aparentado dos representantes do filo Chordata para que possa ser incluído neste último (MOORE, 2003) e confirmam também o monofiletismo de Ambulacraria, indicando que, de fato, Echinodermata e Hemichordata possuem um ancestral comum e estão mais próximos entre si do que de Chordata (ZRZAVY et al., 1998; CAMERON et al., 2000).

De acordo com WINCHELL et al. (2002), os representantes de Chordata juntamente com os de Hemichordata e Echinodermata formam um grupo monofilético composto por animais multicelulares, denominado Deuterostomata (FIGURA 1). Inicialmente, o filo Chaetognatha, os Pogonophora e os Lofoforata também eram incluídos nesse táxon (CAMERON et al., 2000; BLAIR & HEDGES, 2005). Entretanto, a partir de análises moleculares e morfológicas as relações desses grupos com o restante dos deuterostômios mostraram-se incertas, indicando que estes estariam mais relacionados aos protostômios (TUBERVILLE et al., 1994; SWALLA et al., 2000).

O monofiletismo dos deuterostômios é corroborado por dados moleculares (WINCHELL et al., 2002) e pela existência de caracteres anatômicos e embriológicos comuns (TUBERVILLE et al., 1994). Entretanto, as origens e relações entre os diversos grupos que o compõe ainda são controvertidas (BLAIR & HEDGES, 2005). Além disso, um novo filo de animais deuterostômios está sendo proposto (STACH & TUBERVILLE, 2002). Tal táxon é denominado Xenoturbella, constituído por vermes anteriormente considerados platelmintos (CAMERON, 2005), que teriam maior parentesco com os Echinodermata e Hemichordata, sendo grupo irmão dos Chordata (ZENG & SWALLA, 2005).

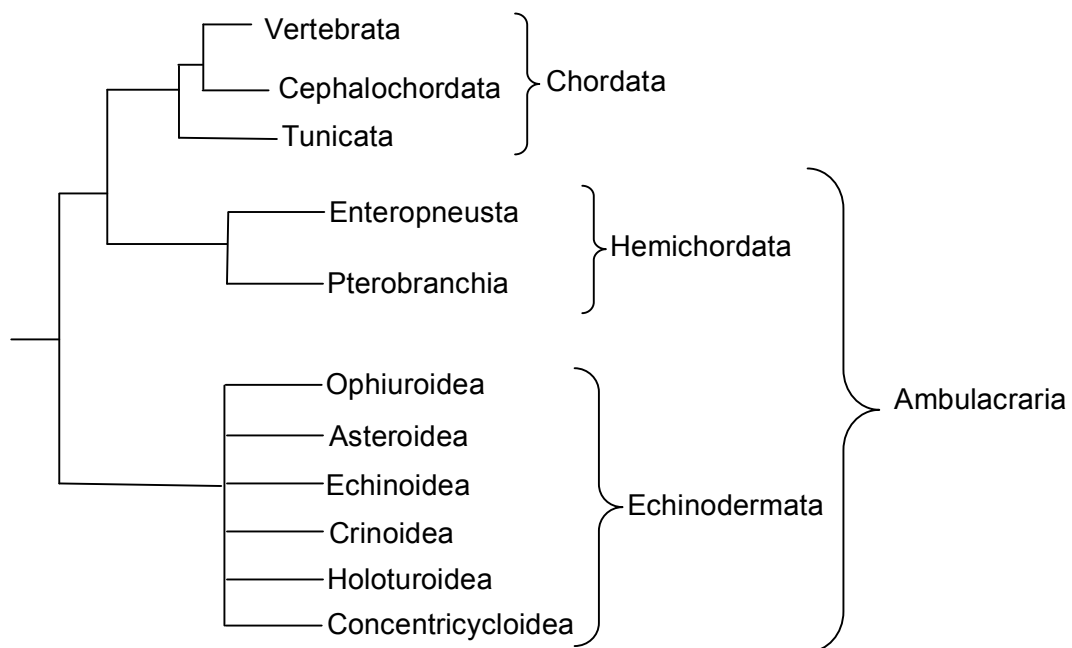


Figura 1 - Árvore filogenética dos Deuterostomata segundo TUBERVILLE et al. (1994).

Como foi possível observar, há grandes discussões a respeito da filogenia de Chordata e dos próprios deuterostômios não havendo, portanto,

um consenso entre os pesquisadores em relação à história evolutiva do grupo (TUBERVILLE et al., 1994).

Um exemplo disso é a presença de diferentes modelos evolutivos para o grupo dos deuterostômios, nos quais o cladograma mais comumente aceito coloca o táxon Echinodermata como grupo irmão do clado formado por Hemichordata + Chordata (FIGURA 2A) (BLAIR & HEDGES, 2005). Há, entretanto, hipóteses que contradizem este cenário e indicam o monofiletismo de Echinodermata + Hemichordata, o que segundo CASTRESANA et al. (1998) é corroborado por dados moleculares (FIGURA 2B). Por outro lado, outros pesquisadores acreditam que as duas propostas acima mencionadas são inexatas, pois o filo Echinodermata seria grupo irmão dos Chordata (FIGURA 2C) (TUBERVILLE et al., 1994).

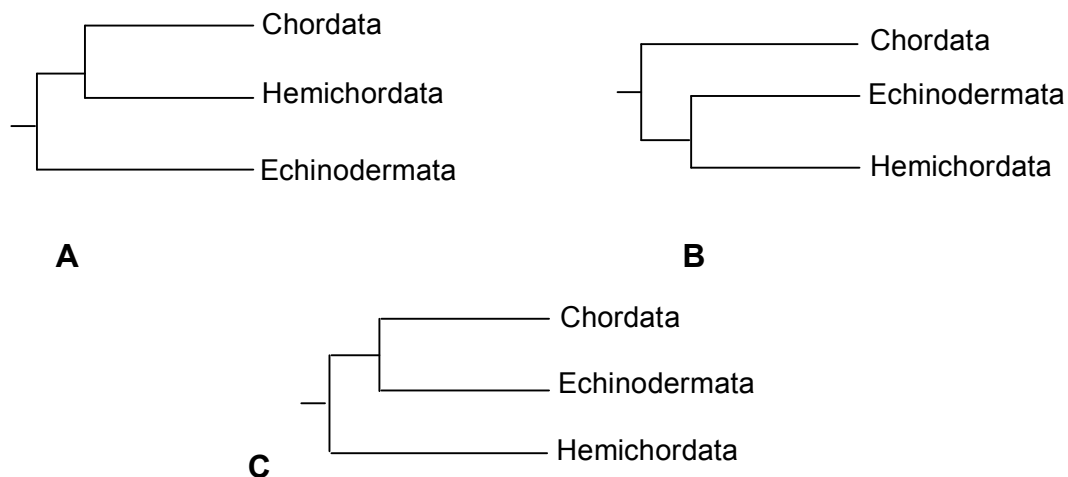


Figura 2- Hipóteses das relações de parentesco entre os deuterostômios, a partir de SCHAEFFER, 1987 apud TUBERVILLE et al. (1994), JEFFERIES, 1986 apud TUBERVILLE et al. (1994).

O entendimento das relações filogenéticas entre e dentro dos táxons Hemichordata e Tunicata é importante para uma melhor compreensão da evolução dos cordados, bem como do seu plano corporal (CASTRESANA et

al., 1998; ZENG & SWALLA, 2005). Além disso, o subfilo Tunicata também apresenta papel de destaque no entendimento das relações evolutivas de Vertebrata e dos deuterostômios (STACH & TUBERVILLE, 2002; TURON & LÓPEZ-LEGENTIL, 2004).

## 1.2- Tunicata

Os representantes do subfilo Tunicata são animais marinhos, sendo a maioria sésil, que possuem o corpo recoberto por uma túnica e apresentam registro fóssil que data de 550 milhões de anos (SHU et al, 2001 apud GISSI et al., 2004).

Tal grupo compreende cerca de 90% dos cordados invertebrados (acraniados), e muitas espécies apresentam hábito colonial, característica única entre os cordados. Além disso, tais organismos compreendem o maior grupo de protocordados, abrangendo cerca de 3.185 espécies (LAMBERT, 2005b).

Os tunicados, que são em sua maioria hermafroditas, incluem tanto organismos de reprodução sexuada, como assexuada, que podem ser sésseis ou planctônicos, solitários ou coloniais, que apresentam notocorda durante todo o seu ciclo de vida ou, mais frequentemente, somente durante o período larval.

Do ponto de vista sistemático, o táxon já foi um dos mais controvertidos (RODRIGUES et al., 1998). Inicialmente, os animais pertencentes a este táxon eram classificados como moluscos, devido à presença de túnicas exteriores resistentes, corpos carnosos moles e grandes brânquias (RUPPERT et al. 2004).

Lamarck foi o primeiro pesquisador a utilizar o termo Tunicata, o qual agrupava ascídias e salpas. No entanto, esta classificação foi alterada por Milne Edwards em 1843, que incluiu o grupo Bryozoa dentro de Tunicata, no táxon Molluscoidea. Em 1850, Hancock fez nova modificação e adicionou os Brachiopoda aos Bryozoa e classificou tal táxon juntamente com Tunicata no grupo Molluscoidea. Finalmente, Huxley reconheceu em 1851 o táxon Tunicata (ascídias, salpas, doliolídeos e appendicularios) como um grupo distinto e separado de Mollusca, Bryozoa e Brachiopoda. Mas foi somente em 1866 que Kowalevsky incluiu os Tunicata como um subfilo de Chordata, depois de ter determinado a natureza cordada das larvas de ascídias. Em vista disso, Balfour (1881) propôs a alteração do termo Tunicata para Urochordata, na tentativa de enfatizar a afinidade dos organismos que compõe tal grupo com os cordados.

Alguns autores consideram o subfilo Tunicata como grupo mais basal dentro da filogenia dos Chordata (GISSI et al., 2004). Além disso, este é um táxon monofilético (TURON & LÓPEZ-LEGENTIL, 2004) que agrupa as classes: Ascidiacea (ascídias), Appendicularia ou Larvacea e Thaliacea (doliolídeos, pirosonos e salpas), sendo que as duas últimas apresentam animais adaptados à vida planctônica e a primeira agrupa espécies bentônicas.

Apesar da classificação mais aceita atualmente dividir os tunicados nas três classes acima mencionadas, não há ainda entre os pesquisadores um consenso quanto a isso, pois Monniot et al. (1975), puseram que há um grande número de espécies de tunicados tão especializados e diferenciados em sua morfologia que não podem ser incluídos dentro de nenhum dos táxons comumente aceitos, propondo desta forma, uma quarta classe, denominada Sorberacea (BRUSCA & BRUSCA, 2002; LAMBERT, 2005b).

Ainda de acordo com LAMBERT (op. cit.), muitos estudiosos não aceitam o táxon Sorberacea, pois não acreditam que estes animais sejam suficientemente diferentes para serem colocados em uma classe específica e propõem que tais organismos sejam enquadrados como ascídias da família Molgulidae. Em vista desse impasse, esta mesma autora indica que estudos moleculares estão sendo realizados a fim de solucionar tal problema de classificação.

Segundo ZENG & SWALLA (2005), as relações entre os três táxons de tunicados ainda são objeto de muito debate, pois ainda não se sabe ao certo qual das classes apresenta o grupo mais basal, pois há pesquisadores que acreditam que as ascídias sejam o grupo mais basal e há aqueles que indicam a classe Thaliacea. Entretanto, WADA (1998) sugere que Appendicularia seria o táxon menos derivado de Tunicata, indicando ainda que esta classificação é corroborada por dados obtidos da análise do esperma dos organismos que compõe este subfilo.

Além de todas as opiniões conflitantes mencionadas, um outro ponto de debate que envolve o grupo Tunicata diz respeito às suas relações dentro de Chordata, pois apesar do monofiletismo deste táxon já ter sido indicado pela análise de dados moleculares (CAMERON et al., 2005), isso não é um consenso entre os pesquisadores, pois de acordo com ZENG & SWALLA (2005) os tunicados apresentam, quando adultos, plano corporal único, além de possuírem sinapomorfias específicas, que incluem a túnica e um sistema circulatório aberto e, portanto, deveriam constituir um filo separado e não um subfilo de Chordata (CAMERON et al., 2000).

### 1.3- Thaliacea

A classe Thaliacea é constituída por representantes planctônicos de hábito filtrador, que habitam preferencialmente mares tropicais e sub-tropicais. Tais organismos são um dos principais componentes do plâncton marinho em todos os oceanos, exceto no Ártico (LAMBERT, 2005b); e tendem a ser menos estudados, pois vivem no oceano aberto e são difíceis de serem capturados em redes de plâncton (ZENG & SWALLA, 2005).

Estes animais fazem diariamente um deslocamento vertical de cem metros ou mais, se alimentando na superfície de fitoplâncton (LAMBERT, 2005b). Além disso, segundo esta mesma autora, tanto os thaliáceos como seus bioprodutos (pelotas fecais) se configuram como uma importante fonte alimentar para diversos organismos marinhos, tais como: radiolários, medusas, tartarugas, pássaros, peixes, dentre outros.

Os thaliáceos são animais coloniais, apesar das salpas e doliolídeos terem ciclos de vida complexos, que incluem alternância de gerações entre formas sexuais solitárias e coloniais assexuadas. Além disso, estes organismos são os únicos tunicados coloniais em que os indivíduos apresentam funções específicas dentro da colônia (ZENG & SWALLA, 2005).

Há três ordens que compõe a classe Thaliacea: Pyrosomida, Doliolida e Salpida (FIGURA 3). As maiores colônias de pirosomos podem chegar a medir vinte metros de comprimento. Em contraste, os doliolídeos apresentam os menores tamanhos, cerca de dois centímetros ou menos (LAMBERT, 2005b). Tais animais possuem órgãos luminescentes, situados na faringe, que portam bactérias responsáveis pela produção de luz quando a colônia sofre algum tipo de perturbação externa (RUPPERT et al. 2004).

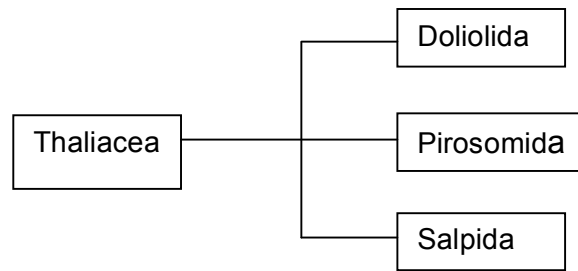


Figura 3- Cladograma indicando as ordens presentes em Thaliacea (ZENG & SWALLA, 2005).

De acordo com LAMBERT (2005b), fatores ecológicos têm indubitavelmente promovido mudanças evolutivas nos taliáceos, o que causa dificuldades em elucidar com maior clareza as relações filogenéticas deste grupo dentro de Tunicata.

#### 1.4- Appendicularia ou Larvacea

A classe Appendicularia contém cerca de 70 espécies de pequenos animais de hábito solitário que são freqüentemente encontrados no plâncton marinho. Os apendiculários são os únicos tunicados que quando adultos continuam a possuir todas as características comuns aos cordados. Além disso, os termos Appendicularia e Larvacea se referem, respectivamente, à cauda que persiste durante toda a vida do animal e à semelhança que estes possuem com as larvas das ascídias.

Os organismos pertencentes a esta classe são organismos holoplanctônicos filtradores, que possuem um eficiente sistema de ingestão de nanoplâncton e apresentam ampla distribuição nos oceanos (BONECKER et al., 2004).

Uma característica dos apendiculários é a presença de um abrigo secretado por estes animais em torno de si, as chamadas “casas”. Tais casas, quando descartadas, como também suas pelotas fecais, formam um montante significativo da neve marinha (material orgânico suspenso que lembra a neve atmosférica), providenciando desta forma uma importante fonte alimentar para outros organismos, tais como as bactérias que promovem sua decomposição, propiciando assim a ciclagem de nutrientes no mar (RUPPERT et al., 2004; LAMBERT, 2005b).

Segundo LAMBERT (op. cit.) vários organismos se alimentam de apendiculários, tais como: copépodos, larvas ou peixes diminutos, medusas, foraminíferos e quetognatos. Como estratégia de defesa, os apendiculários apresentam bioluminescência em seus abrigos, ou podem até mesmo abandonar os mesmos em resposta a estímulos externos, já que o animal é muito menor do que o abrigo que o protege, podendo desta forma nadar em maior velocidade e depois produzir um abrigo novo.

Como dito anteriormente, os apendiculários são animais que retiveram a cauda quando adultos, sendo usualmente interpretado como sendo uma forma neotênica - forma larval que torna-se sexualmente madura (NIELSEN, 1998; MOORE, 2003). Alguns pesquisadores acreditam que, devido a essa retenção caudal, estes organismos sejam os mais relacionados com os tunicados ancestrais. Entretanto, uma alternativa para tal explanação se baseia no estilo de vida derivado destes animais, que se ajusta a sua existência planctônica (ZENG & SWALLA, 2005).

NISHINO & SATOH (2001) indicam que estudos filogenéticos sugerem que Appendicularia representa um grupo irmão do clado formado por todos os

outros tunicados. Além disso, WADA (1998) concluiu a partir de análises moleculares que esta classe foi o primeiro táxon a divergir dentro dos tunicados, e que esta classificação é corroborada por dados obtidos da análise morfológica do esperma de representantes dos Tunicata.

Contudo, isso não é um consenso entre os pesquisadores, pois ZENG & SWALLA (2005) não concordam com o posicionamento deste táxon como grupo basal de Tunicata, pois testes de taxas evolutivas têm mostrado que os apendiculários apresentam taxas de divergência maior do que o restante dos tunicados. Desta forma, os longos ramos produzidos nos cladogramas tendem a confundir os programas filogenéticos, um efeito já referido como “long branch attraction”.

### **1.5- Ascidiacea**

A classe Ascidiacea representa o grupo mais diversificado de cordados inferiores (RODRIGUES et al., 1998), denominados ascídias. Tal classe constitui o mais bem estudado grupo de protocordados e o maior grupo de organismos bentônicos presentes no subfilo Tunicata, o qual compreende aproximadamente 3000 espécies (HUBER et al., 2000; STACH & TUBERVILLE, 2002).

As ascídias podem ocorrer de duas diferentes formas: solitária ou colonial. A forma colonial parece ter surgido independentemente várias vezes em Ascidiacea (RUPPERT, et al., 2004). Espécies solitárias geralmente não apresentam grandes tamanhos, apesar de *Pyura pachydermatia* chegar a medir um metro de comprimento. No entanto, ascídias coloniais podem ser bem maiores podendo facilmente exceder metros, como ocorre com *Distaplia*

*cylindrica* que chega a alcançar o comprimento de sete metros (LAMBERT, 2005b).

Animais adultos apresentam hábito sésil e são, em sua maioria, hermafroditas (ANEXO 1), podendo se reproduzir de duas formas: sexuada e assexuadamente. As formas solitárias apresentam apenas reprodução sexuada, enquanto as formas coloniais reproduzem-se das duas formas. A fusão dos gametas na reprodução sexuada produz uma larva planctônica, sendo esta de curta duração, já que seu desenvolvimento ocorre em torno de minutos ou horas. (LAMBERT & LAMBERT, 1998; LAMBERT, 2002).

A larva das ascídias apresenta uma cauda contendo a notocorda e células musculares. Quando o modo de desenvolvimento inclui este tipo de larva caudada, tem-se o que se denomina desenvolvimento urodelo. Entretanto, algumas poucas espécies de ascídias, com características mais derivadas, não apresentam este tipo de larva, diz-se então, que estas possuem desenvolvimento anuro (JEFFERY et al., 1998).

Quanto a sua taxonomia, as ascídias eram classificadas inicialmente de acordo com seu hábito solitário ou colonial (SWALLA et al., 2000). Posteriormente, Lahille propôs que a classe Ascidiacea fosse dividida com base na estrutura da cesta branquial dos adultos, em três ordens distintas: Aplousobranchiata, Phlebobranchiata e Stolidobranchiata (FIGURA 4) (MONNIOT et al., 1991). Uma alternativa à classificação de Lahille foi proposta por Perrier em 1898, baseada na localização das gônadas. Desta forma, a divisão das ascídias se dá em dois grupos: Enterogona e Pleurogona. Apesar da existência destas duas formas de divisão do grupo Ascidiacea, estas não são contraditórias, baseiam-se apenas em estruturas de órgãos diferentes, mas

que chegam ao mesmo resultado, confirmando assim, a classificação inicial proposta por Lahille (MONNIOT op. cit., FIGURA 5). KOTT (1985) considera Enterogona como ordem, que incluiria Phlebobranchia e Aplousobranchia como subordens, enquanto a subordem Stolidobranchia estaria contida na ordem Pleurogona.

Contudo, nem todos os pesquisadores estão de acordo com as classificações em uso, pois SWALLA et al. (2000) propuseram que além do táxon Stolidobranchiata, há ainda um outro grupo, denominado Aspiculata, que deveria estar incluído dentro de Pleurogona.

Apesar de toda a problemática acerca da sistemática de Ascidiacea, SWALLA et al. (2000) indicaram que a divisão da classe em Pleurogona e Enterogona está de acordo com dados obtidos a partir de análises de seqüências de DNA referentes à região 18S do DNA ribossômico. Contudo, segundo os mesmos autores, baseados nos mesmo dados moleculares, não foi possível corroborar a divisão inicial que agrupava as ascídias em coloniais ou solitárias.

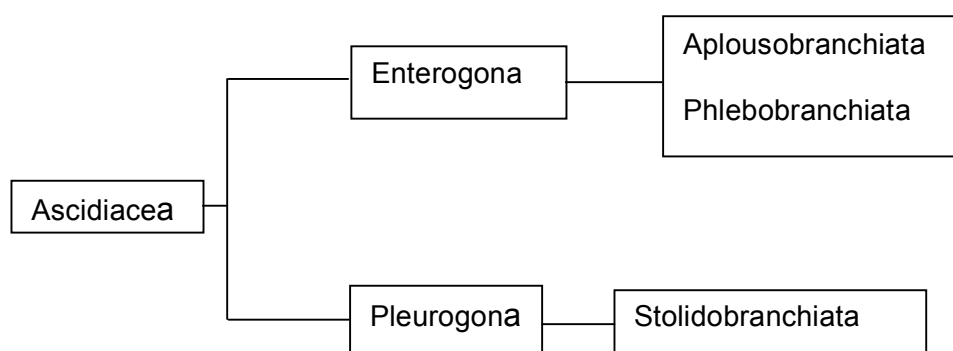


Figura 4- Hierarquia dos táxons em Ascidiacea. Fonte: MONNIOT et al. (1991).

Além das classificações discutidas acima, MICHIBATA et al. (2003) indicam que Webb propôs uma outra hipótese filogenética de Ascidiacea

baseada na capacidade de acumulação de metais (vanádio e ferro) entre os diferentes organismos que compõem as subclasses. Ainda de acordo com MICHIBATA et al. (op. cit.), Webb defendia que em espécies representantes dos táxons Aplousobranchiata e Phlebobranchiata os níveis de vanádio eram altos. No entanto, em organismos do táxon Stolidobranchiata, um grupo mais modificado, estas concentrações não eram tão significativas, sendo grande o conteúdo de ferro. Um outro estudo também relacionado a filogenia de Ascidiacea baseado na acumulação de vanádio levou a conclusão que a divisão das ascídias em Pleurogona e Enterogona estava de acordo com os dados por eles obtidos (Hawkins et al., 1983 apud MORENO, 2003).

Esse tipo de classificação é corroborada pelo trabalho de ANDERSON & SWINEHART (1990) que indicam ainda que não apenas a presença ou ausência de vanádio nos tecidos das diversas espécies são indicadores filogenéticos, mas também seu estado de oxidação.

Apesar de toda a discordância a cerca das origens evolutivas e relações filogenéticas, Tunicata é composto por organismos diversos e fascinantes que estão localizados na base da árvore evolutiva dos cordados, servindo como ponto de comparação para os mecanismos de desenvolvimento regulatório que operam em diversos grupos, tais como: protostômios, deuterostomados não cordados, cordados invertebrados e até mesmo dos vertebrados.

### **Subordem Aplousobranchia**

Os organismos incluídos nesta subordem apresentam a condição branquial supostamente mais basal, no qual a parede da faringe é dotada de perfurações alongadas longitudinalmente (MONNIOT et al., 1991).

Tal subordem compreende majoritariamente ascídias coloniais, divididas em nove famílias (KOTT, 1990). Com relação às relações de parentesco deste táxon com os demais, ainda há dúvidas a serem solucionadas, pois apesar de serem tradicionalmente classificados como um grupo mais aparentado com os representantes de Phlebobranchia, incluídos em Enterogona (MONNIOT et al., 1991), alguns autores acreditam que esta classificação não esteja correta e propõem que Aplousobranchia seja grupo irmão de Appendicularia (STACH & TUBERVILLE, 2002). Entretanto, a filogenia dos apendiculários ainda não é bem compreendida (TURON & LÓPEZ-LEGENTIL, 2004).

### **Subordem Phlebobranchia**

Nesta subordem os animais podem ser tanto coloniais como solitários e apresentam estigmas que podem ser desde pequenos e estreitos até a forma de complexos espiralados. Além disso, tais organismos não possuem pós-abdômen e podem ter ou não epicárdio (MONNIOT et al., 1991; RUPPERT et al., 2004).

Este grupo abrange as famílias Cionidae, Perophoridae, Ascidiidae, Corellidae, Agnesidae, Plurellidae e Octanemidae (KOTT, 1985).

Apesar do subfilo Tunicata ser aceito como monofilético, isso não é verdade quando se relacionam as classes que dele fazem parte. Um exemplo

disso é a constatação de que a classe Thaliacea é relacionada ao táxon Phlebobranchiata (ZENG & SWALLA, 2005).

De acordo com ZENG & SWALLA (op. cit.), a evolução da colonialidade dentro dos flebobranquios é uma questão chave, bem como suas relações com as ascídias representantes de Aplousobranchiata e com os tunicados taliáceos.

### **Subordem Stolidobranchia**

*Stolido* em grego quer dizer pregueado, sendo assim, o termo Stolidobranchia quer dizer brânquias pregueadas.

Segundo STACH & TUBERVILLE (2002), este táxon é monofilético e compreende três proeminentes famílias: Styelidae, Pyuridae e Molgulidae, que agrupam tanto indivíduos solitários, como coloniais.

A maioria das ascídias apresenta uma cauda contendo a notocorda e células musculares. Contudo, uma característica interessante desta ordem é que ela agrupa todas as espécies com desenvolvimento anuro (a larva não apresenta cauda), incluídas nos táxons Molgulidae e Styelidae (KUSAKABE, 2001).

Segundo este mesmo autor, estudos filogenéticos baseados em análises moleculares e morfológicas indicam que o tipo anuro parece ter surgido independentemente dentro da família Molgulidae e que a forma urodela (larva caudada) foi o tipo de desenvolvimento que primeiro surgiu em Ascidiacea. Além disso, embriões anuros não expressam genes da actina muscular, dessa forma não possuem cauda devido a alterações (deleções e/ou inserções) nas regiões codificadoras destes genes, que podem resultar em produtos não

funcionais. NIELSEN (1998) já indicava que este tipo de embrião apresentava “instruções genéticas quase completas para organização da cauda” e que a perda da capacidade de formação da mesma se dava através de mutação de um único gene.

NIELSEN (1998) salientou ainda que estudos baseados em seqüências do DNA ribossômico indicam que o desenvolvimento anuro surgiu pelo menos quatro vezes na família Molgulidae e cinco dentro de Ascidiacea, e que a perda da cauda representaria uma especialização dentro das duas famílias onde ela ocorre.

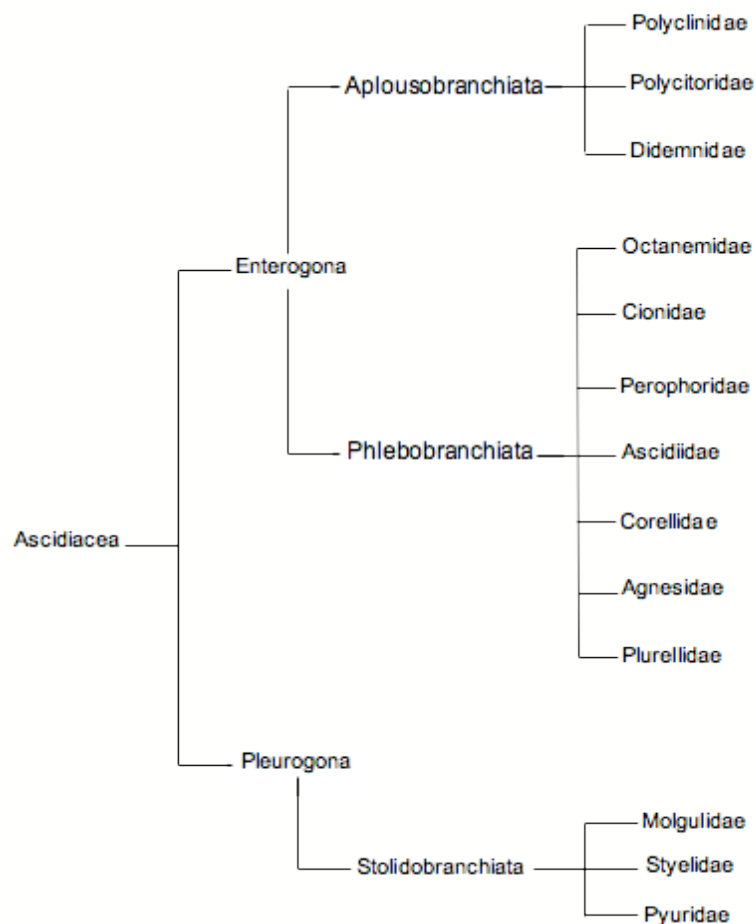


Figura 5- Resumo esquemático da classificação de Ascidiacea segundo MONNIOT et al., (1991).

### 1.6- Utilização da seqüência de *Microcosmus exasperatus* na reconstrução da história filogenética dos Ascidiacea

A ascídia *Microcosmus exasperatus* é solitária, de corpo globoso, que chega a medir até 5 centímetros de comprimento. A variação de tamanho destes animais é bem acentuada, assim como diferenças em suas gônadas (MONNIOT & MONNIOT, 1987). Tais animais podem se fixar e crescer sobre corais, rochas, raízes de mangue e até mesmo em pilares existentes em portos (VAN NAME, 1945; LOTUFO, 2002).

Quanto ao aspecto externo, esta espécie apresenta túnica grossa e resistente, de coloração variando entre o alaranjado e o arroxeado e geralmente incrustada por sedimento ou epibiontes, tais como algas e hidrozoários (FIGURA 6) (MONNIOT & MONNIOT, 1987; RODRIGUES *et al.*, 1998; LOTUFO, 2002).



Figura 5 – Aspecto externo de *Microcosmus exasperatus*.

Segundo MONNIOT (1972) e RODRIGUES et al. (1998) tal espécie é tipicamente cosmopolita, apresentando ampla distribuição em mares tropicais e subtropicais. Este fato já havia sido reportado antes por VAN NAME (1945), que indica a ocorrência desta espécie no Mar Vermelho, costa oeste Africana e Australiana, além de ter examinado exemplares provenientes do Brasil, Estados Unidos, Cuba, dentre outros países.

De acordo com VAN NAME (*op. cit.*), uma das possíveis causas da ampla distribuição de *M. exasperatus* está relacionada ao transporte de indivíduos incrustados nos cascos de navios (ANEXO 1). Desta forma, tal espécie teve sua distribuição natural modificada por meio do transporte mediado pelo homem e, desta forma, sua origem provavelmente nunca será conhecida (LAMBERT, 2001). Além disso, *M. exasperatus* é uma das espécies bioinvasoras mais comuns, com novos registros de sua introdução aparecendo freqüentemente (LAMBERT, *op. cit.*).

Com relação a sua classificação, esta espécie está incluída na subordem denominada Stolidobranchia, a qual abrange, entre outras, a família Pyuridae (FIGURA 7), da qual a espécie é um dos representantes (VAN NAME, 1945; MONNIOT et al., 1991).

## 1.7 - Biologia molecular

A construção de uma árvore filogenética abrangente para todos os organismos é a meta dos filogeneticistas moleculares, pois o entendimento das relações entre os filos animais é de fundamental importância para compreender os modelos de evolução animal do nível genômico até o morfológico (HELFENBEIN & BOORE, 2004). Desta forma, os marcadores moleculares,

que são locos gênicos variáveis utilizados para inferir padrões de diversidade espaço-temporal dos organismos, vem sendo utilizados como uma importante ferramenta para a resolução de problemas envolvendo filogenias (BLEIDORN et al., 2003). Além disso, em muitos casos as técnicas moleculares vem auxiliar na identificação de espécies, as quais não podem ser diferenciadas a partir unicamente de dados morfológicos (KÖSLER et al., 2006).

Segundo LI et al. (2005), há casos em que a construção de árvores filogenéticas baseadas apenas em dados morfológicos não consegue chegar a um resultado satisfatório, pois marcadores morfológicos são fenótipos determinados, muitas vezes, pelo ambiente em que o organismo se encontra, podendo a influência ambiental ser prejudicial à análise se os caracteres forem considerados de forma incorreta.

Um outro problema que se relaciona aos marcadores morfológicos é que estes possuem a desvantagem de serem trabalhados ao nível do organismo inteiro e são em sua maioria dominantes ou recessivos. Por outro lado, marcadores moleculares são co-dominantes e, por isso, apresentam maior quantidade de informação genética por loco (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dessa forma, os marcadores moleculares além de mais seguros possuem outras vantagens em relação aos caracteres morfológicos, pois podem ser trabalhados objetivamente eliminando o problema da subjetividade, além de poderem ser obtidos em grandes quantidades e utilizados para investigar as relações filogenéticas em diversos níveis (MEYER, 1997).

Segundo Nei & Kumar (2000) apud LIMA (2003), afirmam que a comparação de qualquer grupo de organismos é possível a partir de dados de

ácidos nucleicos, pois estes apresentam semelhante composição, o que seria impossível na sistemática filogenética clássica. Além disso, estes mesmos autores indicam que como a mudança evolutiva dos caracteres moleculares pode estar associada a um padrão, é possível a utilização de modelos matemáticos para avaliar as mudanças e comparar os ácidos nucleicos de organismos menos relacionados.

Devido a todas essas vantagens, os dados moleculares estão sendo cada vez mais utilizados para diversas finalidades: estudos de filogeografia, determinação da estrutura populacional, identificação de espécies crípticas, genética de populações e reconstrução das relações de parentesco dos grupos (ROCHA et al., 2002; MCMILLEN-JACKSON & BERT, 2004; SILVA, 2004). Além disso, a utilização destes marcadores surge como uma maneira de esclarecer relações filogenéticas difíceis de abordar por outros métodos, como também uma forma de questionar visões filogenéticas propostas anteriormente (RUSSO, 2001).

Um outro ponto que também pode ser levantado em favor da utilização de marcadores moleculares é que estes podem inclusive auxiliar a promover uma nova visão das relações de parentesco entre os grupos, pois complementam as análises obtidas através de dados paleontológicos, morfológicos e do desenvolvimento (WADA et al., 1992).

### 1.7.1- DNA ribossômico nuclear (nrDNA)

Apesar das ascídias serem utilizadas como modelos em pesquisas relacionadas à poluição marinha (TARJUELO et al., 2001), biologia evolutiva, fisiologia, biologia celular e imunologia, pouco é conhecido a respeito de suas

características genéticas (KANO et al., 2001). Entretanto, este fato vem se modificando, pois já há genomas mitocondriais de ascídias (*Ciona savignyi* e *Ciona intestinalis*) completamente seqüenciados (YOBORI et al., 2003; GISSI et al., 2004) e ferramentas moleculares já vêm sendo utilizadas para elucidar ainda várias questões, tais como dispersão larval, bioinvasão, presença de espécies crípticas, entre outras (YOUNG et al., 1997; LAMBERT, 2005b).

De acordo com MOORE (2003), muito já foi revelado sobre as relações evolutivas dos organismos a partir de genes altamente conservados, como aqueles que codificam para o RNA ribossômico. Por conta disso, diversos trabalhos citam a utilização destes genes para elucidar a filogenia dos mais diferentes organismos nos mais diversos táxons (SWALLA et al., 2000), sejam eles Platyhelminthes (CAMPOS et al., 1998), Insecta (LI et al., 2005), Porífera (ADIS & PETERSON, 2005) ou Molusca (WINNEPENNINCKX et al., 1998; CANAPA et al., 2001).

Além dos grupos já mencionados, esta seqüência também tem sido utilizada por vários pesquisadores na tentativa de solucionar as relações de parentesco entre os principais grupos de Tunicata (TURON & LÓPEZ-LEGENTIL, 2004), a filogenia dos tunicados dentro dos deuterostômios (SWALLA et al., 2000), avaliar classificações antigas dentro de Ascidiacea (MORENO, 2003), bem como esclarecer questões sobre o estilo de vida ancestral dos cordados, a origem da colonialidade em ascídias e a própria relação de parentesco dos cordados (TURON & LÓPEZ-LEGENTIL, 2004).

Segundo GORAB (2001), RNAs ribossômicos são essenciais na fisiologia celular, pois estes componentes interagem com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na

síntese de proteínas sendo, desta forma, os principais produtos de transcrição de uma célula.

O DNA ribossômico nuclear (nrDNA) apresenta-se constituído de seqüências conservadas (18S, 5,8S e 28S e seus homólogos) e não conservadas (ITS- *internal transcribed spacer* e ETS- *external transcribed spacer*) (GORAB, 2001; OLIVERIO et al., 2002; WINCHELL et al., 2002) (FIGURA 7).

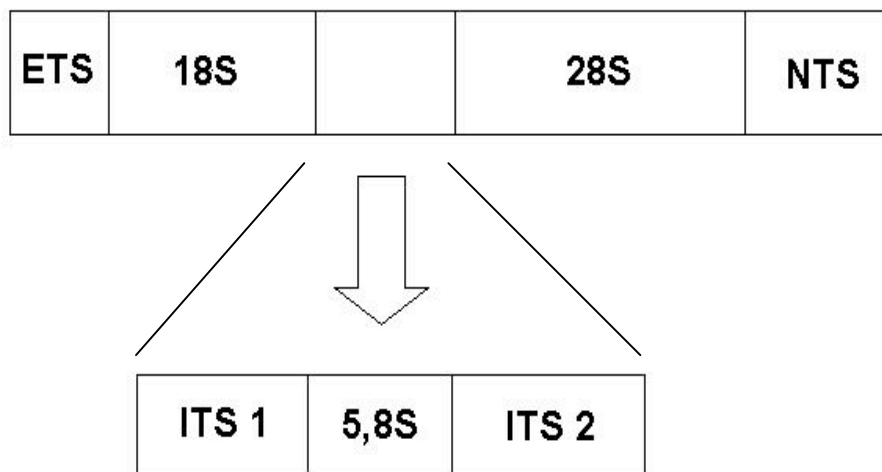


Figura 7- Representação esquemática do nrDNA. ETS, NTS e ITS. Fonte: MATIOLI, 2001.

Tais seqüências se encontram em número variável nos diferentes organismos (YOKOTA et al., 1989) e, nos eucariontes, estas estão agrupadas repetidamente, uma atrás da outra, em uma ou mais regiões cromossômicas (AVISE, 2004; BENDEZU et al., 2005) e são transcritas no núcleo na forma de um precursor simples (pre-RNA), que se apresenta separado por espaçadores internos e externos, os quais são removidos durante o processamento do RNA (SUMIDA et al., 2004). Cópias adjacentes das unidades de repetição do nrDNA

estão separadas por espaçadores não transcritos (NTS), também denominadas espaçadores intergênicos (CARRANZA et al., 1999).

Apesar das regiões NTS não serem transcritas, as seqüências denominadas ITS e ETS o são, sendo crucial a excisão correta destes espaçadores no processamento do pre-rRNA, já que esse passo é fundamental na biogênese de uma unidade ribossomal ativa (OLIVERIO et al., 2002)

As regiões do nrDNA que codificam para as regiões 5,8S, 18S e 28S do rRNA são constituídas por seqüências altamente conservadas (YOKOTA et al., 1989) e que apresentam diferentes taxas de evolução, sendo desta forma largamente utilizados em análises filogenéticas (BARGUES & MAS-COMA, 1997).

Apesar de genes da região 28S também serem utilizados para reconstrução de filogenias (MCARTHUR & KOOP, 1999; GILLESPIE et al., 2005), a região da subunidade menor do nrDNA (18S ou SSU rRNA) sofre menores taxas de mutação em seus genes do que a região 28S, por isso sua eficiência em resolver problemas filogenéticos mais profundos (BARGUES & MAS-COMA, 1997). Entretanto, segundo ABOUHEIF et al. (1998), um fato que deve ser levado em consideração na construção de árvores filogenéticas é que, apesar da região 18S se tratar de uma seqüência conservada, há certa heterogeneidade em seus sítios, fazendo com que existam porções mais conservadas do que outras.

Regiões ITS, por outro lado, apresentam áreas altamente variáveis (RAAHAUGE & KRISTENSEN, 2000), portanto de grande heterogeneidade (YOKOTA et al., 1989), pois apresentam alta taxa de evolução (ADDIS & PETERSON, 2005), sendo utilizados em estudos filogenéticos de táxons que

apresentam divergência evolutiva recente (COLEMAN & VACQUIER, 2002). Além disso, segundo OLIVERIO et al. (2002), tais seqüências são excelentes marcadores utilizados para a distinção de espécies.

As seqüências da região 18S têm sido largamente empregadas na tentativa de inferir relações filogenéticas tanto em táxons distantemente relacionados como em organismos bastante próximos (WIKLUND et al., 2005), por isso mesmo, quando os táxons analisados apresentam grande distância gênica, caso das ascídias, a região 18S do nrDNA ainda assim pode ser utilizada para solucionar suas relações de parentesco (ZENG & SWALLA, 2005).

### **1.8 - Mudanças na seqüência de DNA**

Apesar da molécula de DNA apresentar-se como um material altamente estável (ALBERTS et al., 2004), algumas vezes podem ocorrer erros (mutações) tanto na replicação como no reparo da mesma (GAUR & LI, 1999), e até mesmo erros provocados por meio de fatores ambientais como radiação química ou raios ultravioleta (PAGE & HOLMES, 1998).

De acordo com MEYER (1997), as substituições nucleotídicas se enquadram em dois grupos: transições e transversões; sendo que a primeira indica a substituição de uma purina por outra purina, ou uma pirimidina por outra pirimidina. Já as substituições do tipo transversão indicam a substituição de uma purina por uma pirimidina e vice-versa (PAGE & HOLMES, 1998). Entretanto, é importante salientar que tais tipos de mutações têm diferentes probabilidades de acontecimento (MEYER, 1997), pois normalmente a taxa de transição é maior que a de transversão, uma vez que este último gera

mudanças na molécula de DNA, fazendo com que a probabilidade de acontecer reparo celular neste tipo de substituição é muito maior do que no evento de transição (MIYAKI et al., 2001). Contudo, as probabilidades de ocorrência de tais eventos vão se modificando à medida que a divergência entre as seqüências analisadas aumenta, decrescendo o número de transições em relação ao de transversões (SCHNEIDER, 2003).

Um outro ponto a ser discutido com relação às mutações está relacionado à inserção e deleção de um nucleotídeo em uma seqüência de DNA, os quais são coletivamente classificados como *indels* (GAUR & LI, 1999). Tal termo é empregado pois não se pode determinar se ocorreu a inserção ou a deleção numa seqüência analisada de DNA (CALCAGNOTTO, 2001).

Ainda relacionado aos *indels*, PAGE & HOLMES (1998) indicam que a presença de inserções e deleções são eventos que ocorrem mais comumente em regiões não codificadoras, mas que algumas vezes podem existir em regiões codificadoras causando freqüentemente efeitos deletérios.

Além dos casos já mencionados, as inversões também são um outro tipo de modificação no DNA, que ocorre por meio da remoção de parte de um segmento de nucleotídeos, com a sua posterior inserção na mesma localização só que em sentido inverso (PURVES et al., 2002).

### **1.9 - Sistemática filogenética**

Desde a antiguidade o homem tem necessidade de sistematizar a diversidade biológica (MIYAKI et al., 2001). Desta forma, os sistemas de classificação dos organismos tem registros que datam da Grécia antiga, com Platão e Aristóteles (AMORIM, 2002).

Segundo este mesmo autor, os primeiros sistemas de classificação baseavam-se no agrupamento dos organismos com base em suas semelhanças morfológicas, persistindo essa visão mesmo depois da teoria da evolução ter sido proposta. Dessa maneira, havia uma certa contradição no modo de classificar os seres, já que a sistemática praticada não levava em conta o processo evolutivo, mas apenas a formação de grupos com base em caracteres parecidos.

Foi nesse cenário que Willi Henning (1966) criou um novo método de reconstrução das relações de parentesco dos seres vivos, denominado sistemática filogenética (AMORIM, 2002), a qual indicava que “organismos que compartilhassem condições derivadas (apomórficas) de caracteres poderiam ser hipotetizados como sendo descendentes da espécie ancestral na qual a condição primitiva (plesiomórfica) passou (por mutação) à condição derivada” (MIYAKI et al., 2001).

Desse modo, a reconstrução filogenética consiste em estimar as supostas relações de ancestralidade para um conjunto de táxons, o que é representado graficamente pelas árvores filogenéticas que consistem de nós (internos e externos) e ramos (FIGURA 8) (WILEY et al., 1991; MIYAKI op. cit., 2001; AVISE, 2004), onde no final destes, ou seja, nos nós terminais tem-se as unidades taxonômicas operacionais - OTU (operation taxonomic unity) (AMORIM, 2002), que podem ser fósseis ou seres ainda não extintos (DESALLE, 2005), como também, no caso de estudos moleculares, alelos não recombinantes (AVISE, 2004) e genes específicos (MOUNT, 2004).

Segundo MOUNT (2004) e MEIDANIS & SETÚBAL (1994), a topologia da árvore, ou seja, a forma como ela é organizada e as posições relativas aos nós indicam as relações de ancestralidade entre as OTUs.

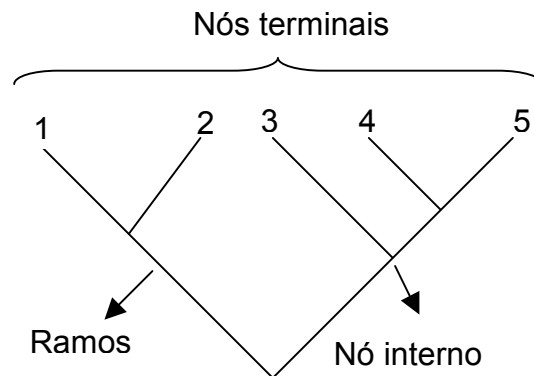


Figura 8 – Representação de uma árvore filogenética com as indicações de ramos, nós internos e externos e OTUs (referentes aos números 1, 2, 3, 4 e 5).

Um outro conceito importante em reconstrução filogenética é denominado grupo externo ou “*outgroup*”, que corresponde ao ancestral comum mais próximo dos organismos do grupo interno (“*ingroup*”) (MIYAKI et al., 2001). Conforme YOON & KIM (2000) e MEIDANIS & SETÚBAL (1994), o táxon escolhido como *outgroup* servirá para enraizar o cladograma, dar sentido temporal à análise de um grupo, ou seja, estabelecer a direção das modificações ocorridas entre os táxons, indicando quais características são apomórficas e quais são plesiomórficas (MIYAKI et al., op. cit.). Desta forma, estes mesmos autores indicam que o grupo externo não deve ser relacionado de maneira distante com as OTUs do grupo interno, pois isso poderia resultar em um grande número de homoplasias.

Quanto à representação da árvore, esta pode ocorrer de forma enraizada ou não (AVISE, 2004) (FIGURA 9). Aquelas que não apresentam raiz indicam apenas a topologia entre as diversas OTUs (MIYAKI, 2001),

refletindo meramente as distâncias entre as unidades, sem que seja expressa a noção de ancestralidade (WEIR, 1996). Contudo, árvores enraizadas nos dão a noção de ordenamento temporal entre as unidades taxonômicas e informação a cerca do ancestral comum do grupo.

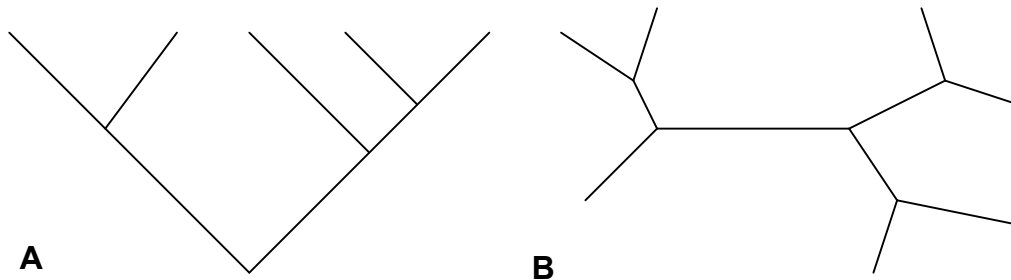


Figura 9- Representação de uma árvore enraizada (A) e não enraizada (B).

Outros pontos importantes tratados em filogenia são os conceitos de monofilia e polifilia. Grupos monofiléticos são aqueles que incluem um ancestral único comum e todas as espécies descendentes desse ancestral. Já a polifilia é caracterizada quando partes de dois ou mais grupos monofiléticos diferentes são reunidas (MIYAKI ET AL, 2001; SCHNEIDER,2003).

Com relação ainda às árvores filogenéticas, AMORIM (2002) cita que é importante fazer a distinção entre cladograma, que “é um dendograma que expressa relações filogenéticas apenas entre táxons terminais, ou seja, as conexões entre as espécies indicam apenas que há uma história comum e não uma espécie ancestral propriamente dita”, e árvore filogenética que “expressa relações filogenéticas tanto em táxons terminais, quanto entre espécies ancestrais e descendentes”.

### 1.10- Filogenia molecular

Filogenias são ferramentas de grande importância, não somente para estabelecer relações evolutivas entre um grupo de organismos, mas são utilizadas também para prever futuras tendências em doenças infecciosas, resistências a medicamentos e a indicação do ancestral comum das formas viventes (CLEMENT et al., 2000).

O termo filogenia molecular se refere à filogenia macromolecular, ou seja, o estudo dos padrões de ancestralidade e o grau de parentesco entre os organismos, pelo uso dos dados moleculares como seqüências de ácidos nucléicos e proteínas, inserções ou elementos transponíveis, ou outros marcadores moleculares (LIMA, 2003).

Entretanto, é necessário conhecer os genes que se está trabalhando, pois genes diversos podem indicar diferentes histórias evolutivas (MOUNT, 2004). Desta forma, é cada vez mais comum os biólogos moleculares construir árvores filogenéticas no intuito de procurar genes ortólogos e parálogos de diferentes organismos (NEI & KUMAR, 2000).

Genes parálogos são genes derivados por duplicação dentro de um genoma e que desenvolvem novas funções (BARNES & GRAY, 2003). Já os genes ortólogos retêm a mesma função e divergiram por especiação no curso da evolução (BARNES & GRAY, op. cit.), ou seja, ortólogos ocorrem em diferentes espécies, mesmo tendo a mesma função, já os genes parálogos existem no mesmo genoma, mas possuem funções diferentes (GIBAS & JAMBECK, 2001).

De acordo com MEYER (1997), moléculas ortólogas nos transmitem informações sobre a história evolutiva dos organismos, pois divergiram de um

ancestral único, tratando-se assim do mesmo gene presente em diversas espécies. Desta forma, as filogenias moleculares só pode ser inferidas de forma correta se as seqüências de DNA comparadas corresponderem a genes ortólogos (PAGE & HOLMES, 1998), pois apenas a diferença entre tais genes dentro das diferentes espécies reflete eventos de especiação (SCHINEIDER, 2003).

De acordo com MEYER (1997), é absolutamente necessário comparar genes ortólogos para sugerir eventos filogenéticos, do contrário, a inferência que estaria sendo realizada seria a história evolutiva dos genes e não dos organismos. Contudo, BAXEVANIS et al. (2002) indica que a comparação de organismos não pertencentes à mesma espécie pode levar os pesquisadores a comparar genes parálogos na ausência de ortólogos, o que comprometeria a análise filogenética (MEYER op. cit.)

### **1.11- Bioinformática**

A bioinformática, também conhecida como biologia computacional, é uma ciência interdisciplinar que envolve vários campos de estudo como: biologia, ciência da computação, matemática e estatística (MOUNT, 2004), tendo surgido como resultado do avanço de tecnologias experimentais, em particular da grande quantidade de seqüências de DNA (CREIGHTON, 1999).

Tal ciência é um campo de pesquisa novo, que emprega ferramentas computacionais avançadas (NAHUM, 2001) e depende de melhorias tanto na área de *software* como de *hardware*, além de facilidades como a utilização da rede mundial de computadores (internet) (LESK, 2002).

## **Bancos de dados**

Segundo CREIGHTON (1999), desde a iniciação do Projeto Genoma Humano, por volta da década de 80, o esforço de seqüenciar genomas de organismos simples a complexos, que vão desde bactérias ao homem, vem conseqüentemente aumentando a necessidade de formação de bancos de dados e tecnologias associadas à interpretação de tais seqüências. Em vista disso, há quatro bancos de dados públicos que guardam/estocam as seqüências nucleotídicas dos diversos organismos que já tiveram parte ou todo o seu DNA seqüenciado, sendo eles: GenBank, Genome Sequence DataBase (GSDB), ambos dos Estados Unidos; o European Molecular Biology Laboratory (EMBL) e Nucleotide Sequence Database, todos dois do Reino Unido e o DNA Database of Japan (DDBJ) (CASEY, 1992).

Concomitante à criação de repositórios para guardar a enorme quantidade de seqüências produzidas nos laboratórios, também se fez necessária a criação de programas que realizassem busca de seqüências em bancos de dados, para determinar dentre as milhares de seqüências armazenadas aquela que seria potencialmente a mais relacionada com a seqüência de interesse (BAXEVANIS et al., 2002). Desta forma, vários programas foram desenvolvidos a partir de algoritmos, com a finalidade de permitir comparações (alinhamentos) de seqüências de DNA produzidas (query) com todas as seqüências de domínio público depositadas em bancos de dados (PROSDOCIMI et al., 2002).

O primeiro programa a realizar tal função foi o FASTP para busca de proteínas e uma outra versão para procura de ácidos nucléicos, o FASTN, os

quais foram unidos em um programa único denominado FASTA (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994). Tal programa faz pesquisas otimizadas para alinhamentos locais, utilizando para tanto uma matriz de substituição retornando a seqüência mais próxima, ou seja, o alinhamento considerado melhor.

Posteriormente, surgiu um outro programa denominado BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), o qual é atualmente a ferramenta mais utilizada na procura de regiões de similaridade local (PERTSEMLIDIS & FONDOR III, 2001), tanto pelo poder de identificar seqüências similares, como pela sua rapidez (BEDELL et al., 2003). Tal programa não visa conduzir uma comparação de extensão total das moléculas comparadas. Na verdade, o que se identifica no banco de dados é a presença de uma seqüência parecida (similar) àquela pesquisada (ALTSCHUL et al., 1990; PROSDOCIMI et al., 2002). No programa BLAST são utilizadas janelas, cada uma contendo 12 bases, que são comparadas com as seqüências depositadas nos bancos de dados. A partir destas janelas, chamadas “sementes”, o alinhamento é estendido nas duas direções sem a adição de buracos. Desse modo, os resultados não produtivos são descartados logo no início (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994).

Nesse programa há um parâmetro, o valor de “E” ou *E value*, calculado a partir de sofisticadas teorias estatísticas, que expressa a dificuldade de encontrarmos uma seqüência perfeitamente idêntica nos bancos de dados, ou seja, este valor demonstra a chance de tal comparação ter sido encontrada por simples coincidência (MEIDANIS & SETÚBAL, op. cit.). Segundo estes mesmos autores, o resultado desta busca retorna aquelas seqüências

depositadas com maior similaridade sem buracos e que teria a menor probabilidade de ter sido encontrada ao acaso.

### **Alinhamento múltiplo e edição de seqüências**

De acordo com MOUNT (2004), o ponto de início para construção de uma árvore filogenética é o alinhamento múltiplo das seqüências, pois somente a partir disso é possível a comparação de seqüências para o estudo dos modelos de evolução entre os diferentes organismos (CHENNA et. al., 2003).

Um alinhamento consiste em realizar a comparação de duas ou mais seqüências (alinhamento múltiplo) “escrevendo-as” uma sob a outra de maneira a formar colunas com caracteres iguais (MOUNT,2004). O objetivo do alinhamento é fazer com que a posição (sítio) de cada base nitrogenada ou aminoácido das seqüências que estejam sendo comparadas fique uma sob a outra (RUSSO, 2001; SCHNEIDER, 2003) (FIGURA 10).

Entretanto, essas colunas idênticas nem sempre ocorrem, pois a presença de inserções e ou deleções de nucleotídeos durante o processo evolutivo pode vir a gerar seqüências homólogas de DNA de tamanhos diferentes (CALCAGNOTTO, 2001), por isso a inserção de buracos (*gaps*) em pontos arbitrários deve ser realizada no intuito de representar tais eventos, de modo que as seqüências apresentem bases igualmente alinhadas (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994; PROSDOCIMI et al.,2002; SCHNEIDER, 2003).

Além das inserções e deleções, um outro problema enfrentado são as mutações do tipo substituição, ou seja, aquelas do tipo transição e transversão, que originam no alinhamento uma série de bases desemparelhadas (MEYER, 1997). Desse modo, procura-se valorizar bases igualmente alinhadas e

penalizar alinhamentos de bases desiguais ou que contenham buracos (MEIDANIS & SETÚBAL, 1994).

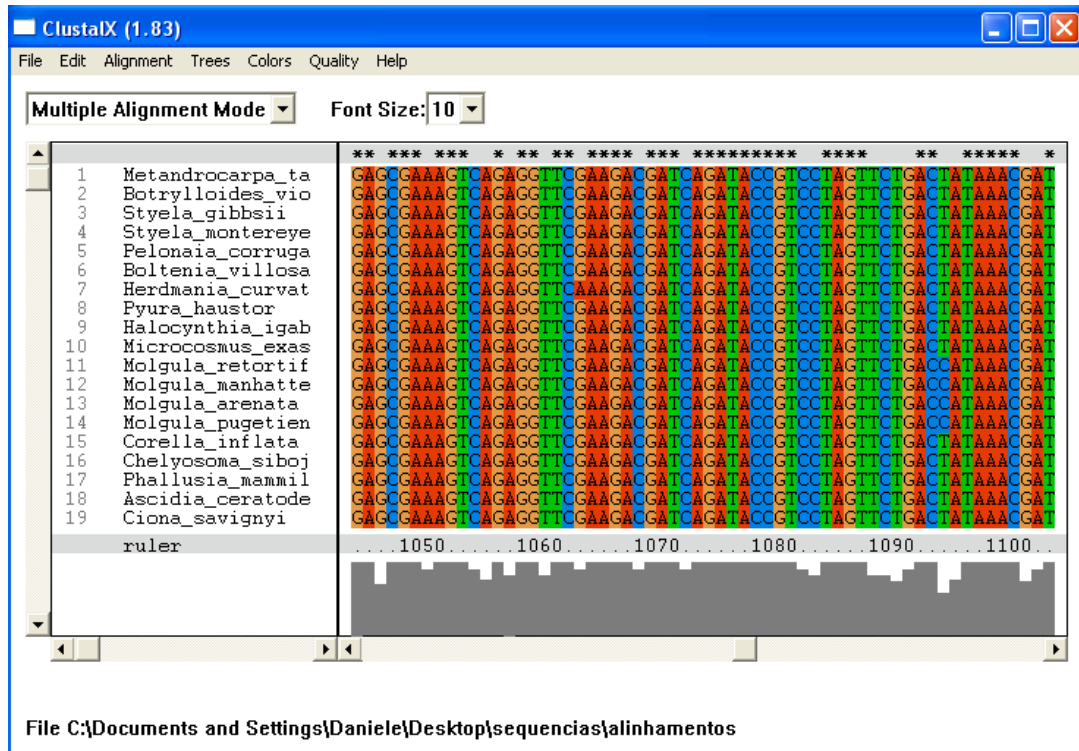


Figura 10- Alinhamento múltiplo das seqüências de representantes de Tunicata por meio do programa ClustalX.

Há duas formas de se fazer o alinhamento das seqüências: por meio do alinhamento inteiro (global) ou somente em certas regiões (alinhamento local) (CHENNA et al., 2003). O primeiro tipo de alinhamento visa alinhar a seqüência inteira, utilizando para tanto o maior número possível de caracteres sendo, deste modo, mais interessante se utilizado para seqüências muito conservadas ou que apresentem alto grau de similaridade. O alinhamento local é útil para alinhar seqüências não muito conservadas, pois neste tipo de alinhamento porções similares das seqüências são alinhadas e então estendidas até encontrar pares de bases diferentes. Desse modo, há a formação ilhas de bases pareadas e não pareadas entre as seqüências (MOUNT, 2004).

Atualmente, para realizar tais tipos de alinhamento, encontram-se disponíveis diversos programas computacionais especializados (RUSSO, 2001). Contudo, o programa mais comumente utilizado para alinhamento global de seqüências múltiplas é o Clustal (CHENNA et al., 2003). Neste programa o alinhamento é feito em duas etapas. Inicialmente, todas as seqüências são comparadas par a par e uma medida de similaridade máxima é calculada entre cada duas seqüências. Baseando-se no cálculo obtido anteriormente, as seqüências dos grupos mais relacionados são alinhadas primeiro, em seguida as que se conectam a estas, e assim por diante, até que todas as demais seqüências sejam alinhadas gradualmente (THOMPSON et al., 1997; RUSSO, 2001).

Segundo SCHNEIDER (2003) o alinhamento múltiplo das seqüências indica uma hipótese de homologia entre as bases dos táxons estudados. Desse modo, uma indicação verdadeira da filogenia entre os grupos depende mais do alinhamento correto das seqüências analisadas do que dos métodos de construção filogenética (BROWN, 2000; LIMA, 2003).

Devido a essa grande importância e complexidade do alinhamento, é de fundamental importância o uso de um editor de seqüências para que seja realizada uma inspeção no alinhamento, de modo a corrigir possíveis erros, como também para a codificação de inserções ou deleções (BROWN, 2000; SCHNEIDER, 2003) (FIGURA 11).

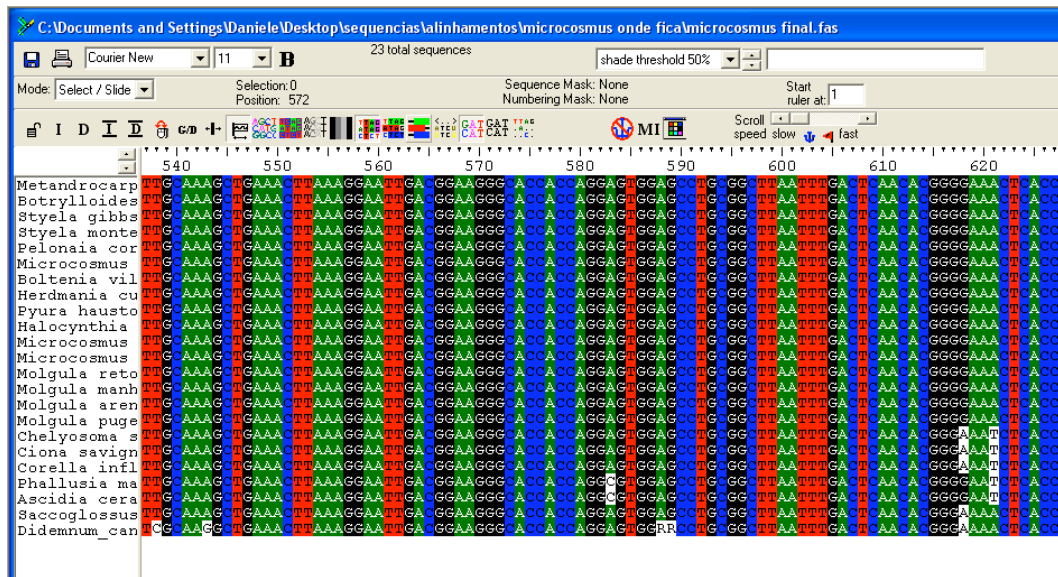


Figura 11- Edição do alinhamento múltiplo realizado para as seqüências de Tunicata por meio do programa BioEdit.

### Construção de cladogramas

De acordo com GRAUR & LI (1999) os dados moleculares podem ser classificados em duas diferentes categorias: os caracteres e as distâncias. Os primeiros podem ser uma altura, peso, ou até mesmo a posição de um nucleotídeo em cada táxon sob estudo (GRAUR & LI, op. cit.). Já os dados de distância se referem à quantificação dos nucleotídeos que diferem entre seqüências alinhadas de DNA (PAGE & HOLMES, 1998).

RUSSO et al. (2001) indicam que os métodos baseados em caracteres analisam cada sítio separadamente construindo ao final uma árvore a partir dos próprios caracteres. Os métodos de distância, por outro lado, comparam seqüências homólogas de DNA reduzindo a variação entre estas a uma única medida de distância, a qual é utilizada para elaboração da árvore final.

Conhecendo a natureza destes dados moleculares, há vários métodos estatísticos que podem ser utilizados para reconstrução da filogenia molecular dos grupos, sendo os principais e mais comuns classificados em três

categorias: métodos de distância, métodos de verossimilhança e métodos de parcimônia (NEI & KUMAR, 2000). Apesar da diversidade dos métodos empregados, nem as aplicações práticas nem teóricas destes algoritmos são aceitas por todos os pesquisadores (NEI & KUMAR, 2000).

Quanto ao método de máxima parcimônia, assume-se que este se baseia em um modelo de evolução onde uma mudança é mais provável que duas (MIYAKI et al., 2001), ou seja, o princípio da máxima parcimônia indica que a topologia que requer o menor número de mudanças evolucionárias (substituição nucleotídica) é a mais aceita para explicar os dados (GRAUR & LI, 1999).

Segundo os mesmos autores, este princípio foi primeiramente formulado por William de Ockham, que indica que a melhor hipótese é aquela que requer o menor número de passos. Nesse método, o número de mudanças evolucionárias em uma árvore filogenética é simplesmente a soma do número de mudanças em cada sítio.

De acordo com PAGE & HOLMES (1998) entre as vantagens da máxima parcimônia estão a facilidade do seu entendimento, pois não há muitas suposições a cerca do processo evolutivo, além da grande diversidade de softwares que o utilizam e o fato de ser um método extensivamente estudado matematicamente. Contudo, estes mesmos autores indicam que em alguns modelos de evolução a máxima parcimônia mostra-se não consistente, possibilitando a construção de uma árvore não verdadeira, onde em determinadas topologias acontece o que se denomina atração de ramos longos ( "long branch attraction").

Segundo MIYAKI et al. (2001), apesar do nome, o fenômeno de long branch attraction não está relacionado ao tamanho dos ramos, mas à ocorrência de táxons que apresentam taxas de evolução tão elevadas que as demais OTUs são agrupadas erroneamente por não serem tão divergentes. Desse modo, a presença de seqüências com taxas de evolução muito discrepantes ou quando estas são muito divergentes é que levam à formação de tal efeito. Uma maneira de contornar tal problema se dá pela adição de novas seqüências àquela filogenia (PAGE & HOLMES, 1998).

Os métodos de distância se baseiam na idéia de que se conhecemos a distância evolutiva atual entre os táxons a partir de seu conjunto de seqüências, é possível reconstruir a história evolutiva das mesmas (PAGES & HOLMES, 1998). Nestes métodos duas etapas são requeridas: o cálculo da distância propriamente dita (a partir destes cálculos uma matriz de distância é obtida) e a construção da topologia (RUSSO et al., 2001; SCHNEIDER, 2003).

Para a obtenção das distâncias, diversos algoritmos podem ser utilizados. Desse modo, para termos confiança na topologia apresentada, é necessário empregarmos o método correto (POSADA & CRANDAL, 1998). Devido a essa grande dificuldade de escolha do modelo de substituição mais apropriado, foi desenvolvido o programa Model Test, que compara modelos progressivamente mais complexos a partir de análises estatísticas e escolhe o modelo de evolução de DNA que mais se adequa aos dados observados (SCHNEIDER, 2003).

Após a construção da matriz de distâncias, é necessário escolher um algoritmo de reconstrução da árvore propriamente dita. Um dos algoritmos mais utilizados é denominado *Neighbor-joining* (NJ) ou agrupamento de vizinhos, um

método heurístico que proporciona rapidez computacional e que se assemelha na prática ao método de evolução mínima (PAGE & HOLMES, 1998).

Este método inicia a análise com uma árvore em forma de estrela, ou seja, sem resolução. Em seguida, procura-se o par de vizinhos que minimize a soma total dos ramos da árvore. Este par será a primeira bifurcação ou resolução da árvore, e serão tratados, a partir de então, como uma única unidade. Depois o segundo par que minimize a soma total dos ramos da árvore é procurado, agrupado com o outro par e tratado como uma única unidade. Esse processo continua até que se obtenha uma árvore completamente resolvida. Assim, a cada passo, procura-se os vizinhos (*neighbors*) que minimizam a soma total dos ramos (RUSSO et al., 2001).

Um outro algoritmo de construção de topologias é o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means*), o qual foi inicialmente desenvolvido para construção de fenogramas taxonômicos, mas posteriormente passou ser utilizado também para construção de topologias de cladogramas moleculares (GRAUR & LI, 1999).

Este método baseia-se em uma construção de cladogramas ultramétricos, ou seja, todas as extremidades são eqüidistantes da raiz da árvore (PAGE & HOLMES, 1998). Além disso, estes mesmos autores indicam que este algoritmo assume o princípio do relógio molecular para a construção de topologias, ou seja, ele assume que todas as seqüências evoluem a uma taxa constante.

Segundo BROWN (2000) este é o modelo mais simples e de fácil interpretação, pois o algoritmo agrupa o par de OTUs com menor distância e recalcula a matriz de distância assumindo que o agrupamento anterior é uma

OTU única. A partir dos dados obtidos pelo recálculo da matriz, o método une agora a OTU com menor distância, ocorrendo tal processo até que todos os táxons sejam incluídos na árvore filogenética final.

Entretanto, apesar da facilidade do emprego deste algoritmo, o fato dele assumir o relógio molecular pode levar à construção de cladogramas irreais quando se analisam seqüências com taxas evolutivas diferentes (NEI & KUMAR, 2000). Além disso, os autores acima citados indicam que erros também podem ocorrer quando as seqüências analisadas apresentam pequeno número de nucleotídeos.

Outro algoritmo que também emprega o método de distâncias é denominado evolução mínima (*minimum evolution*). Tal modelo tem a mesma essência do método da máxima parcimônia, pois procura a árvore que apresenta o menor comprimento dos ramos (MIYAKI et al., 2001).

De acordo com NEI & KUMAR (2000), neste método a soma de todos os tamanhos dos ramos são estimados, ou seja, ocorrem cálculos para todas as possíveis topologias, sendo escolhida aquela topologia que apresenta os menores valores.

### **Teste de confiança em topologia**

O *bootstrap* é uma técnica computacional que testa a confiabilidade das árvores filogenéticas inferidas (NEI & KUMAR, 2000).

A base do método consiste de uma simples re-amostragem com reposição pseudoaleatória dos dados. Inicialmente, uma árvore é construída baseada na seqüência de nucleotídeos ou aminoácidos, que passa a ser a

árvore original. Em seguida, o programa faz uma re-amostragem na ordem dos aminoácidos ou nucleotídeos da seqüência original para a construção da primeira árvore réplica. Em cada reamostragem, o número total de dados mantém-se constante. Contudo, uma nova árvore-réplica é construída. Esse procedimento é obtido várias vezes até que, ao final, o teste compare cada uma das árvores-réplica com a árvore original. (RUSSO et al., 2001; LIMA, 2003).

Desse modo, os valores de *bootstrap* apresentados são simplesmente a porcentagem de vezes que o mesmo agrupamento original foi recuperado nas árvores-réplicas (RUSSO et al. op. cit.).

De acordo com GRAUR & LI (1999) e RUSSO et al. (2001), os valores de *bootstrap* são interpretados como sendo os níveis de confiança para cada clado, ou seja, eles revelam a consistência interna de dados, se a topologia modifica muito conforme a re-amostragem de dados. Por tanto, quanto menores forem os valores de *bootstrap*, menor será a confiabilidade de uma árvore filogenética (RUSSO et al., op. cit.).

Apesar do método de *bootstrap* ser amplamente utilizado como teste de confiança de topologias (GRAUR & LI, 1999), ele apresenta certas desvantagens em sua utilização, pois NEI & KUMAR (2000) indicam que neste teste as árvores filogenéticas precisam ser construídas para cada conjunto de dados, portanto, demandando um elevado tempo computacional, principalmente para conjuntos de dados analisados sob o método da máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Além disso, um outro ponto negativo é que os valores de *bootstrap* tendem a sobreestimar elevados níveis de confiança e subestimar baixos valores (GRAUR & LI op. cit.)

## **2- Objetivos**

### **Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi de avaliar as relações filogenéticas entre os Tunicata e mais particularmente entre os Ascidiacea, utilizando seqüências do DNA ribossômico nuclear.

### **Objetivos específicos**

- Viabilizar um protocolo de extração de DNA genômico para *Microcosmus exasperatus* baseado no reagente CTAB.
- Amplificar por PCR e seqüenciar a região 18S do DNA ribossômico nuclear de *M. exasperatus*.
- Avaliar o grau de parentesco entre os Ascidiacea e deste grupo dentro dos Tunicata e Chordata.
- Confrontar os dados obtidos com a classificação atual de Ascidiacea.

## **3- Materiais e Métodos**

### **3.1. Coleta dos animais**

A coleta dos exemplares de *Microcosmus exasperatus* ocorreu por meio de mergulho livre, utilizando o método de coleta manual. Tais organismos se encontravam em áreas portuárias de Fortaleza e Pécem, ambos localizados no Ceará, sobre pilastras sombreadas, em torno de dois metros de profundidade. Os animais coletados foram acondicionados em recipientes plásticos contendo água do mar e posteriormente levados ao Laboratório de Biologia Aquática do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (LBA - UFC), onde foram identificados a partir de consulta bibliográfica, utilizando-se para tanto RODRIGUES et al. (1998) e LOTUFO (2002).

Os lotes com os exemplares receberam um número de tombo e os organismos foram então acondicionados em recipientes contendo álcool 96%, visando preservar seus tecidos para posterior análise do material genético.

### **3.2. Isolamento do DNA genômico**

O DNA genômico dos animais foi isolado de acordo com um método baseado no uso do reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), modificado a partir daquele descrito por GROSBERG (1996).

Inicialmente, foram realizadas análises a fim de estabelecer qual a região do animal seria mais eficiente para a extração do DNA genômico. Desta forma, os animais tiveram sua túnica removida a fim de evitar contaminações

do seu DNA pela presença de outros organismos, já que *Microcosmus exasperatus* apresenta túnica recoberta por animais epibiontes. Foram empregados dois métodos diferentes para a extração de DNA de *M. exasperatus*. No primeiro foram utilizados apenas o lado direito do animal. No segundo método, todo o animal foi utilizado para a extração de DNA. Entretanto, estes tiveram suas cestas branquiais removidas visto que nestas normalmente se encontram organismos em seu interior. Além disso, seus conteúdos intestinais foram esvaziados a fim de tornar a solução de CTAB menos viscosa.

Além da procura da melhor região do corpo de *M. exasperatus* para a extração de DNA, também foram realizados testes no intuito de se verificar qual a quantidade de peso seco mais eficiente para esta extração. Desta forma, foram aferidos os pesos 0,3; 0,2 e 0,1 g para tais testes.

Realizadas as análises acima detalhadas, chegou-se a conclusão que para a extração de DNA deveriam ser retirados 0,3 g do animal, os quais foram congelados em nitrogênio líquido e macerados com auxílio de grau e pistilo até que fosse obtido um pó fino, o qual foi transferido para um tubo eppendorf estéril (1,5 ml) contendo 5 µl de proteinase K (solução estoque de 25 mg/ml) e 500 µl do tampão de extração 2XCTAB (Tris-HCl 1 M, pH 8,0, NaCl 4 M, EDTA 0,5 M, CTAB 2% (v/v) e 1 µl de 2-Mercaptoetanol 0,2 % previamente aquecido a uma temperatura de 65°C. O extrato foi então incubado em banho-maria por duas horas e os tubos invertidos a cada 30 minutos.

Logo após essa etapa, foram adicionados 500 µl de PCI (25 partes de fenol: 24 partes de clorofórmio: 1 parte de álcool isoamílico) aos tubos contendo o material incubado e estes misturados por inversão. Os tubos foram

então centrifugados a 8.000 rpm durante 18 minutos numa centrifuga mini-spin Eppendorf, para que a fase aquosa (superior) e orgânica (inferior) fossem separadas.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf de mesmo volume contendo 500 µl de CI (24 partes de clorofórmio: 1 parte de álcool isoamílico) e centrifugado a 8000 rpm por 18 minutos.

O sobrenadante foi novamente transferido para um tubo estéril, e a este foi adicionado 1 ml de etanol 95% gelado. Após a mistura da solução por inversão do tubo, o material foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  de um dia para o outro e em seguida centrifugado a 8000 rpm por 20 minutos.

Na etapa seguinte, o etanol foi retirado e o pellet de DNA lavado com 400µl de etanol 70%. Uma centrifugação foi realizada a 3000 rpm por 3 minutos seguida de outra lavagem com etanol 70%.

O pellet foi seco ao ar até que todo o álcool evaporasse e foi então ressuspendido em 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

A quantificação do DNA genômico obtido foi calculada a partir das medidas de absorvância a 260nm obtidas por meio de um espectofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Bioetch).

### **3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose a pH neutro**

O DNA genômico e os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e 1%, respectivamente, a fim de se avaliar a qualidade do DNA genômico e dos produtos de PCR obtidos.

O gel para visualização das amostras foi preparado a partir de uma solução aquecida de agarose e TBE 0,5X (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM), à qual se adicionou posteriormente brometo de etídio (EtBr), de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989). O tampão de corrida utilizado foi TBE 0,5X e a corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100mA (para DNA genômico) e 150mA (para produto de PCR).

Em cada poço do gel foram aplicados aproximadamente 5µl do produto de amplificação da PCR e 3µl do tampão de amostra (glicerol 30%, TE pH 8,0, azul de bromofenol 0,25%).

A eletroforese foi finalizada quando o azul de bromofenol alcançou 2/3 do comprimento total do gel. Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas com luz UV (302nm) em um transluminador MacroVue (Pharmacia Biotech) e o gel fotografado com máquina Polaroid GelCam.

Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA λ digerido com *Hind* III e DNA φX-174 digerido com *Hae* III (Pharmacia Biotech do Brasil), sendo o primeiro utilizado como marcador para DNA genômico e o segundo como indicador da quantidade de pares de base para os produtos de PCR.

#### **3.4. Amplificação da região 18S do nrDNA, por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)**

O fragmento de DNA correspondente à região 18S do nrDNA foi amplificada por PCR utilizando-se como substrato DNA genômico previamente isolado e oligonucleotídeos (Invitrogen) específicos para as extremidades que flanqueiam a região 18S (Tab. 1).

Tabela 1- Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região-alvo.

Oligonucleotídeos utilizados	Seqüência dos oligonucleotídeos	Sentido do anelamento
18SF1	GTCATATGCTTGTCTCAAAGA	5'→3'
18SR1.1	TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC	3'→5'
18SF2	TAATTCCAGCTCCAATAG	5'→3'
18SR2	CCACCCATAGAATCAAGA	3'→5'
18SF3	GGCACCACCAGGAGTGGA	5'→3'
18SR3	CAATGATCCTTCCGCAGG	3'→5'

Em um tubo eppendorf estéril de 150 $\mu$ l foi preparada uma mistura com os componentes indicados na tabela 2. Todos os componentes foram incluídos, com exceção do DNA genômico e da água estéril, que foram diretamente adicionados em tubos Axygen Scientific (USA) 0,2 $\mu$ l, os quais posteriormente receberam uma alíquota de 150 $\mu$ l da mistura, totalizando um volume de 25 $\mu$ l por reação.

O controle negativo foi realizado adicionando todos os componentes acima especificados, com exceção do DNA genômico e, no lugar deste, foi acrescida água Milli Q estéril para completar o volume necessário para a reação de PCR .

O processo de amplificação se deu a partir do uso de um termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., USA), conforme indicado na Tabela 3. Após o último ciclo, as amostras permaneceram estocadas a 4 °C no termociclador até que fossem estocadas em freezer. Para análise do produto da reação, uma

alíquota de 5µl foi removida e submetida a eletroforese em gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente.

Tabela 2- Constituintes e volumes utilizados na preparação da mistura.

Componentes da reação de PCR	Volume utilizado
Tampão de reação 10 X*	2,5 µl
BSA	2,5 µl
Mistura de dNTP's (1,25mM cada)	5,0 µl
Oligonucleotídeo 5' (5µM)	2,5 µl
Oligonucleotídeo 3' (5µM)	2,5 µl
DNA genômico (100ng/ml)	1µl
H <sub>2</sub> O miliq estéril	8,8µl
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/µl)	0,2 µl

\* Tris-HCl 100mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 15mM e KCl 500mM

Tabela 3– Condições de amplificação da região 18S.

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1º ciclo	Desnaturação	95	3
	Anelamento	50	1
	Extensão	72	1
2º ao 29º ciclo	Desnaturação	95	1
	Anelamento	50	1
	Extensão	72	1
último ciclo	Desnaturação	95	1
	Anelamento	50	1
	Extensão	72	9

### 3.5. Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR (fragmentos de DNA) amplificados foram previamente diluídos em água destilada estéril, nas proporções 1:5, 1:3 ou 1:2, de acordo com a intensidade da banda de DNA visualizada no gel de agarose. Dessa diluição foram requeridos 5  $\mu$ L para reação de seqüenciamento, a qual foi realizada utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante.

Após o último ciclo da reação de seqüenciamento (Tabela 4), os fragmentos obtidos foram submetidos à etapa de precipitação, que consiste na remoção de sais e produtos provenientes do kit de sequenciamento que não foram incorporadas aos produtos de PCR. O processo de precipitação consistiu em diversas centrifugações e à adição de isopropanol, etanol e *loading solution*.

Tabela 4- Condições da reação de sequenciamento

Ciclo	Temperatura	Tempo
1°	95°C	20 seg.
2°	50°C	15 seg.
3°	60°C	1 min.
4° ao 25°	95°C	20 seg.

As reações de seqüenciamento de DNA foram analisadas em um seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), segundo as seguintes condições de injeção da amostra: 1Kv por 160s, 1 Kv por 120s, 2 Kv por 60s.

### 3.6. Montagem das seqüências consenso

As seqüências brutas obtidas do seqüenciador foram analisadas por meio do programa Sequence Analyzer do seqüenciador MegaBACE 1000, o qual é utilizado com o intuito de elaborar as seqüências consenso, apenas seqüências de boa qualidade, diminuindo assim erros de montagem.

A partir da escolha das melhores seqüências foi utilizado o pacote de programas PhredPhrapConsed para a montagem da seqüência final/consenso: o programa Phred (EWING, 1998), identifica as seqüências de DNA geradas pelo seqüenciador, o Phrap permite sua visualização e o programa Consed (GORDON, 1998) permite a visualização e edição das mesmas, obtendo-se assim uma seqüência consenso.

### 3.7. Busca em bancos de dados públicos

Em poder da seqüência consenso da região 18S do nrDNA de *M. exasperatus* foi realizada uma busca no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), das seqüências que mais se relacionavam com a seqüência de *M. exasperatus*, no intuito de confirmar os dados obtidos do sequenciamento e determinar se havia similaridade dessa seqüência consenso com as demais seqüências já depositadas no referido banco de dados.

### 3.8. Alinhamento múltiplo das seqüências.

Em posse das seqüências necessárias à construção das árvores filogenéticas, foi realizado o alinhamento múltiplo das seqüências, utilizando para tanto o programa ClustalX (THOMPSON, 1997), seguindo os parâmetros de alinhamento descritos em SCHNEIDER, 2003.

Foram realizados um total de quatro alinhamentos, sendo no primeiro utilizadas seqüências dos grupos Echinodermata, Hemichordata, Cephalochordata, Vertebrata e Tunicata, no segundo utilizadas apenas as seqüências de representantes do filo Chordata (Vertebrata, Cephalochordata, Myxini e Tunicata) e de *Sacoglossus pusillus*, o qual foi escolhido como grupo externo. No terceiro alinhamento somente as seqüências de Tunicata foram alinhadas, com *S. pusillus* novamente escolhido como grupo externo; e por fim teve-se o alinhamento dos representantes de Ascidiacea (com a inclusão das seqüências de *Microcosmus caudicans* e *M. sulcatus*) (Tabela 5).

Tabela 5- Espécies que tiveram suas seqüências 18S copiadas do GenBank com seu respectivo número de acesso no referido banco de dados e classificação.

Acesso no GenBank	Espécie	Classificação
AY133474	<i>Holothuria impatiens</i>	Echinodermata; Holothuroidea
AF088805	<i>Luidia foliolata</i>	Echinodermata; Asteroidea
AF236799	<i>Harrimania planktophilus</i>	Hemichordata; Enteropneusta
M97571	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordata; Cephalochordata

Acesso no GenBank	Espécie	Classificação
AY428817	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	Chordata; Cephalochordata
M97574	<i>Myxine glutinosa</i>	Chordata; Vertebrata
AB193735	<i>Auxis rochei</i>	Chordata; Craniata; Vertebrata
DQ222453	<i>Bos taurus</i>	Chordata; Craniata; Vertebrata
AB013015	<i>Oikopleura sp.</i>	Chordata; Tunicata; Appendicularia
D14366	<i>Thalia democratica</i>	Chordata; Tunicata; Thaliacea
AB013013	<i>Doliolum nationalis</i>	Chordata; Tunicata; Thaliacea
AB013011	<i>Pyrosoma atlanticum</i>	Chordata; Tunicata; Thaliacea
AY116615	<i>Didemnum candidum</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Aplousobranchia Didemnidae
AY116614	<i>Clavelina picta</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Aplousobranchia Clavelinidae
AY116612	<i>Amaroucium stellatum</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Aplousobranchia Synoicidae
L12443	<i>Styela montereyensis</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Styelidae

<b>Acesso no GenBank</b>	<b>Espécie</b>	<b>Classificação</b>
L12440	<i>Pelonaia corrugata</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Styelidae
AY903925	<i>Halocynthia igaboja</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Pyuridae
AY903926	<i>Pyura haustor</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Pyuridae
AF165827	<i>Herdmania curvata</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Pyuridae
AY903924	<i>Boltenia villosa</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Pyuridae
AY903922	<i>Metandrocarpa taylori</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Styelidae
AY903923	<i>Styela gibbsii</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Styelidae
AY903930	<i>Corella inflata</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Phlebobranchia; Corellidae
AF165821	<i>Chelyosoma siboja</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Phlebobranchia; Corellidae

<b>Acesso no GenBank</b>	<b>Espécie</b>	<b>Classificação</b>
AF236803	<i>Phallusia mammilata</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Phlebobranchia; Ascidiidae
AIDRG18S	<i>Ascidia ceratodes</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Phlebobranchia; Ascidiidae
AF165823	<i>Ciona savignyi</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Phlebobranchia; Cionidae
AY903919	<i>Molgula arenata</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Molgulidae
AY903921	<i>Molgula retortiformis</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Molgulidae
AY903920	<i>Molgula pugetiensis</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Molgulidae
L12426	<i>Molgula manhattensis</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Molgulidae
AY903927	<i>Botrylloides violacea</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Styelidae
DQ149331	<i>Microcosmus claudicans</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Pyuridae

Acesso no GenBank	Espécie	Classificação
DQ149330	<i>Microcosmus sulcatus</i>	Chordata; Tunicata; Ascidiacea; Stolidobranchia; Pyuridae

### 3.9. Edição dos alinhamentos por meio do programa BioEdit.

Tendo em mãos as seqüências já alinhadas, foi realizada uma inspeção dos alinhamentos à procura de possíveis falhas nos mesmos. Além disso, muitas seqüências que apresentassem tamanhos diferentes foram cortadas para que todas apresentem um tamanho final único. Tais edições foram realizadas manualmente, com o auxílio do programa Bioedit, versão 5.0.9. (Hall, 1999).

### 3.10. Verificação da qualidade do sinal filogenético e o teste do modelo de substituição nucleotídica

A partir dos alinhamentos e da posterior edição dos mesmos, foi realizado o teste de saturação de substituições com o auxílio do programa DAMBE (Data Analysis Molecular Biology and Evolution) versão 4.065 (Xia & Xie, 2001).

Além disso, utilizando o programa Model Test (Posada & Crandall, 1998), que é executado como uma sub-rotina do programa PAUP\* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Swofford, 1998), foi indicado que o modelo que melhor se adapta as seqüências analisadas é o de Tamura-Nei (1993) atribuindo o parâmetro da distribuição gama ( $\gamma$ ) para todos os conjuntos de dados.

### 3.11. Construção das árvores filogenéticas.

As análises filogenéticas foram realizadas com o auxílio do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001), utilizando distribuições g (gama) e o modelo de evolução indicado pelo programa Model Test.

Tais análises foram realizadas utilizando diferentes algoritmos para construção de topologias de árvores filogenéticas, tais como: UPGMA e *neighbor-joining*. Além disso também foi utilizado o método de máxima parcimônia para reconstrução das relações de parentesco entre os grupos. Todas as análises citadas foram realizadas utilizando o teste de confiança *bootstrap* com 1000 replicações.

Devido a grande heterogeneidade das seqüências utilizadas para reconstrução filogenética, quanto mais específicos se tornavam os agrupamentos, mais difícil se tornava o alinhamento do conjunto de dados. Dessa forma, alguns táxons foram retirados dos cladogramas quando estes se tornavam mais específicos, primando pela manutenção do maior número de informação genética possível.

## **4- Resultados**

### **4.1- Extração de DNA genômico**

O método de extração e isolamento de DNA baseado no reagente CTAB (Brometo de cetiltrimetilamonio) mostrou-se eficiente no isolamento dos ácidos nucleicos de *Microcosmus exasperatus*. Inicialmente foram realizados experimentos para verificar a quantidade em gramas mais oportuna para uma eficiente extração de DNA, bem como a identificação da região do animal que melhor produziria DNA genômico de qualidade. Desta forma, foi observado que a quantidade ideal de tecido seria de 0,3 g e a utilização de todo o animal foi mais eficiente para o propósito ao qual se destinava.

Na eletroforese em gel de agarose a 0,8% em presença de brometo de etídio pode-se perceber a presença de uma única banda com tamanho de aproximadamente 23 Kb (FIGURA 12).

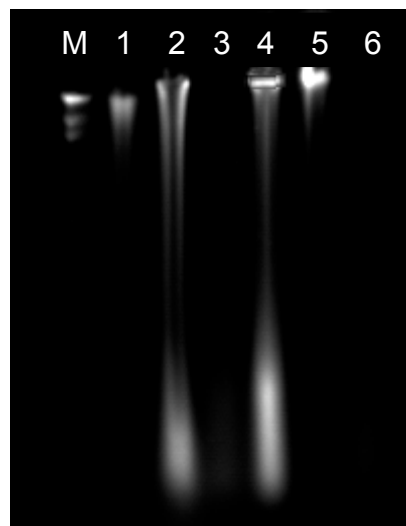


Figura 12- Eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo EtBr a 0,5µg/ml, visualizado em luz UV. M- marcador de alto peso molecular; 1- 0,3 gramas do lado direito do animal; 2- 0,2 gramas do lado direito do animal; 3- 0,1 grama do lado direito do animal; 4- 0,3 gramas do animal inteiro; 5- 0,2 gramas do animal inteiro; 6- 0,1 grama do animal inteiro.

#### 4.2- Amplificação da região 18S do nrDNA de *Microcosmus exasperatus*

Os produtos de PCR correspondentes às amplificações da região 18S do nrDNA foram visualizados a partir de eletroforese em gel de agarose 1%. Foi constatada, a partir da análise da eletroforese, a amplificação de um único fragmento de DNA correspondente a cerca de 600 pb em todas as amostras estudadas (FIGURA 13).

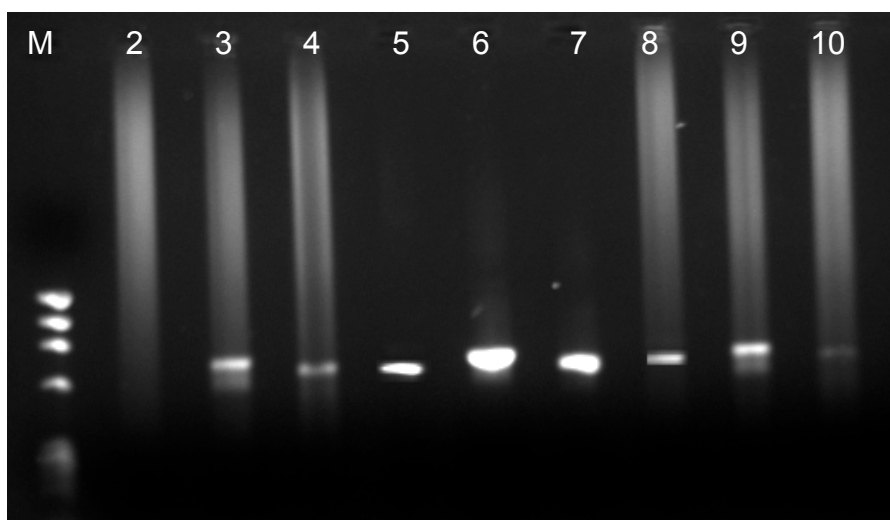


Figura 13- Eletroforese em gel de agarose 1% contendo EtBr a 0,5 $\mu$ g/ml, visualizado em luz UV. Poço 1: marcador de baixo peso molecular; Poços 2, 5 e 8: primeiro segmento do 18S (nrDNA); Poços 3, 6 e 9: segundo segmento do 18S (nrDNA); Poços 4, 7 e 10: terceiro segmento do 18S (nrDNA).

#### 4.3- Alinhamento múltiplo de seqüências

A partir da busca realizada no banco de dados do GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) por meio da ferramenta BLAST foi possível constatar que a região seqüenciada de *Microcosmus exasperatus* de fato correspondia à região 18S do nrDNA dos demais ascidiáceos. Esse fato foi constatado tanto pela similaridade apresentada entre esta seqüência e as demais seqüências depositadas no GenBank, como pelos valores de E ou E

*value* que apresentaram-se muito próximos de 0, indicando assim que é muito pequena a probabilidade desta seqüência ter sido obtida ao acaso.

A partir dos alinhamentos realizados foi possível perceber a presença de *indels* e diversas substituições de base do tipo transição e transversão. Além disso, foi possível perceber em algumas seqüências um grande número de inserções, bem como diversidade do tamanho das seqüências, o que representou uma dificuldade no alinhamento e edição das mesmas.

Um outro fato que também pôde ser percebido durante o alinhamento foi a presença de regiões que apresentam estrutura secundária altamente conservada, correspondentes a regiões denominadas *loop*.

#### **4.4- Saturação das substituições de bases**

A partir da análise dos dados obtidos pelo teste de saturação de substituições foi possível perceber que a taxa de transição/transversão está aumentando de forma linear com o tempo, portanto, os dados não se mostraram saturados e por isso podem ser utilizados para inferir filogenias (FIGURA 14).

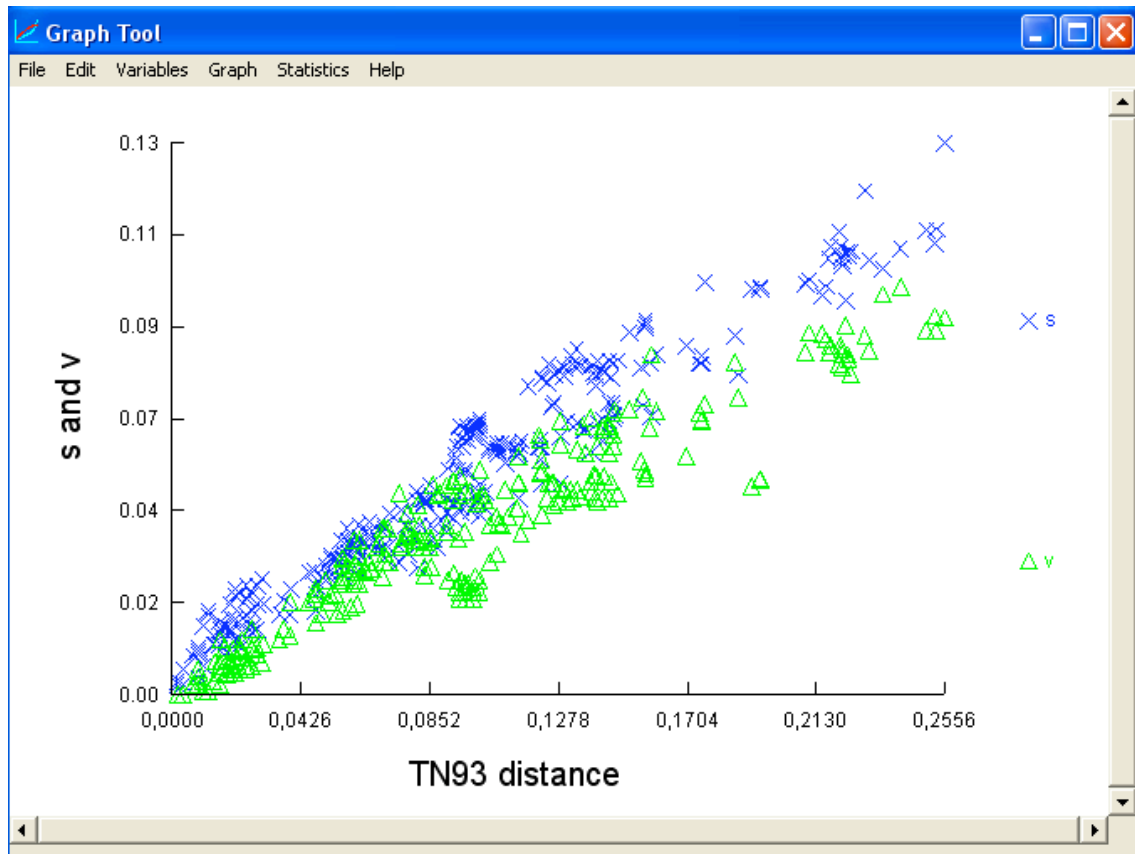


Figura 14- Gráfico da taxa de transições (XS) e transversões (DV) versus a divergência das seqüências utilizando o modelo de Tamura-Nei (1993), para os dados provenientes da região do nrDNA 18S.

#### 4.5- Análises de agrupamento e as matrizes de distância

A composição nucleotídica das seqüências abordadas neste trabalho, bem como o conteúdo GC das diferentes seqüências podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6- Táxons analisados no trabalho indicando sua composição nucleotídica e o comprimento final das seqüências, após alinhamento e edição das mesmas (T = timina, C = citosina, A = adenina G = guanina).

Táxons analisados	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	Total
<i>Boltenia villosa</i>	24.8	22.5	23.3	29.4	1172
<i>Herdmania curvata</i>	24.9	22.0	23.5	29.5	1195
<i>Pyura haustor</i>	24.4	22.3	23.5	29.8	1164

<b>Táxons analisados</b>	<b>T(%)</b>	<b>C(%)</b>	<b>A(%)</b>	<b>G(%)</b>	<b>Total</b>
<i>Metandrocarpa taylori</i>	25.2	22.2	23.1	29.5	1171
<i>Botrylloides violacea</i>	25.0	21.7	23.9	29.4	1194
<i>Styela gibbsii</i>	25.0	22.3	23.4	29.3	1198
<i>Molgula manhattensis</i>	26.3	20.8	24.2	28.8	1196
<i>Styela montereyensis</i>	25.3	22.0	23.5	29.2	1198
<i>Pelonaia corrugata</i>	25.0	22.4	23.4	29.3	1198
<i>Microcosmus exasperatus</i>	25.4	22.3	23.1	29.2	1168
<i>Halocynthia igaboja</i>	24.7	22.7	23.5	29.1	1162
<i>Molgula retortiformis</i>	26.4	20.7	24.1	28.8	1197
<i>Molgula arenata</i>	25.9	20.9	24.4	28.8	1195
<i>Molgula pugetiensis</i>	25.1	22.0	23.9	29.0	1197
<i>Corella inflata</i>	25.5	22.0	23.2	29.3	1162
<i>Chelyosoma sibaja</i>	25.1	22.5	22.7	29.8	1169
<i>Phallusia mammilata</i>	23.5	23.6	22.4	30.6	1197
<i>Ascidia ceratodes</i>	24.1	23.2	22.5	30.2	1197
<i>Ciona savignyi</i>	25.0	22.4	22.8	29.8	1020
<i>Pyrosoma atlanticum</i>	24.6	22.6	23.1	29.7	1189
<i>Thalia democratica</i>	25.8	21.7	23.3	29.2	1127
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	22.3	24.7	22.6	30.4	1148
<i>Branchiostoma floridae</i>	22.4	24.5	22.6	30.5	1160
<i>Myxine glutinosa</i>	20.3	25.8	20.9	33.0	1189
<i>Auxis rochei</i>	22.6	24.6	23.1	29.7	1206
<i>Bos taurus</i>	21.5	25.9	22.1	30.5	1213

<b>Táxons analisados</b>	<b>T(%)</b>	<b>C(%)</b>	<b>A(%)</b>	<b>G(%)</b>	<b>Total</b>
<i>Holothuria impatiens</i>	22.7	24.7	22.5	30.1	1266
<i>Luidia foliolata</i>	21.7	24.8	22.9	30.6	1177
<i>Harrimania planktophilus</i>	22.5	24.7	21.8	31.0	1215
<i>Saccoglossus pusillus</i>	22.8	24.7	22.0	30.4	1217
<i>Doliolum nationalis</i>	23.7	23.0	22.7	30.6	1181
<i>Oikopleura sp.</i>	27.5	20.0	25.2	27.3	1153
<i>Microcosmus sulcatus</i>	24.5	21.9	24.2	29.5	654
<i>Microcosmus claudicans</i>	24.2	22.0	24.3	29.5	658
<i>Didemnum candidum</i>	28.8	17.9	26.3	27.0	911
Total	24.4	22.8	23.2	29.7	1172.8

#### 4.6- Cladogramas

Os cladogramas (FIGURAS 15 a 30) foram obtidos através do programa Mega utilizando o modelo de substituição nucleotídica de Tamura-Nei com diferentes valores de distribuição gama para cada grupo de dados analisados (tabela 7). Foram empregados diferentes algoritmos de topologias com o intuito de verificar se existem diferenças nos cladogramas obtidos.

Tabela 7- Valores de distribuição gama empregados para os conjuntos de dados.

Conjunto de dados analisados	Parâmetros para distribuição gama	Proporção de sítios invariáveis
Ambulacraria + Chordata	0,5290	0,2809
Chordata	0,5643	0,3027
Urochordata	0,5780	0,3557
Ascidiacea	0,5615	0,3677

Cladogramas de Ambulacraria + Chordata

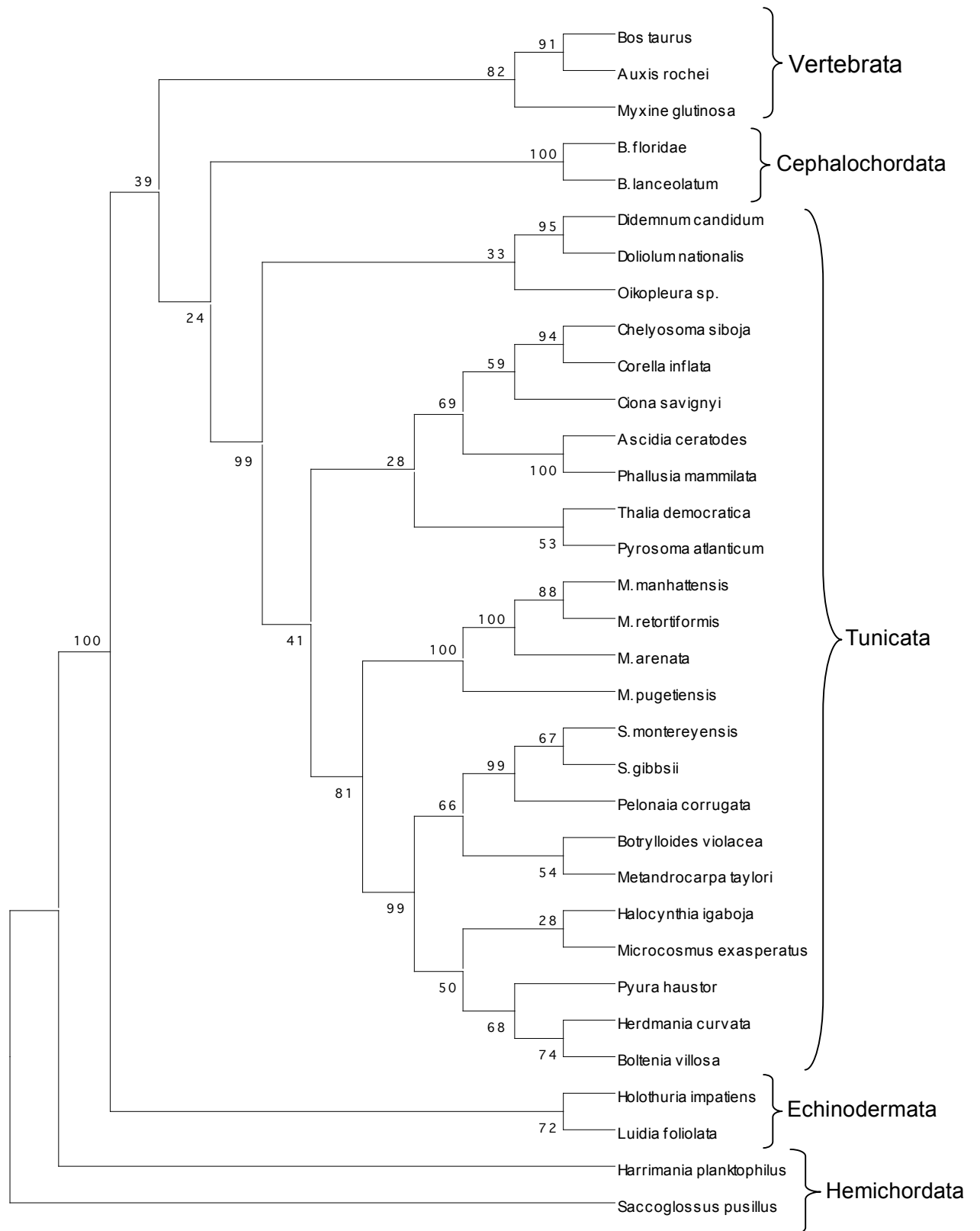


Figura 15- Cladograma obtido pelo método *Neighbor-joining* para os deuterostômios estudados. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *boostrap* (1000 replicações).

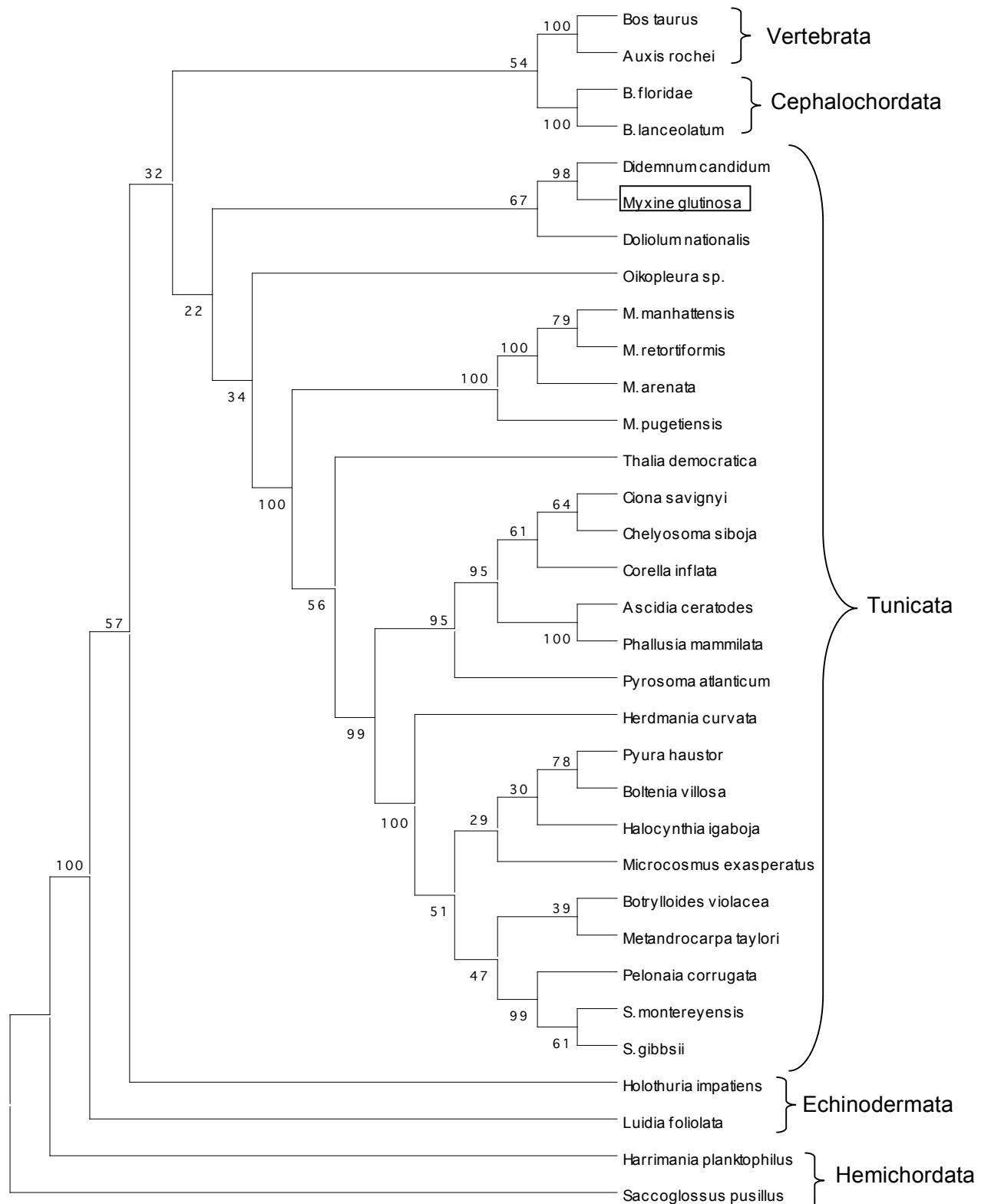


Figura 16- Cladograma obtido pelo método UPGMA para os deuterostômios estudados. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *boostrtrap* (1000 replicações).

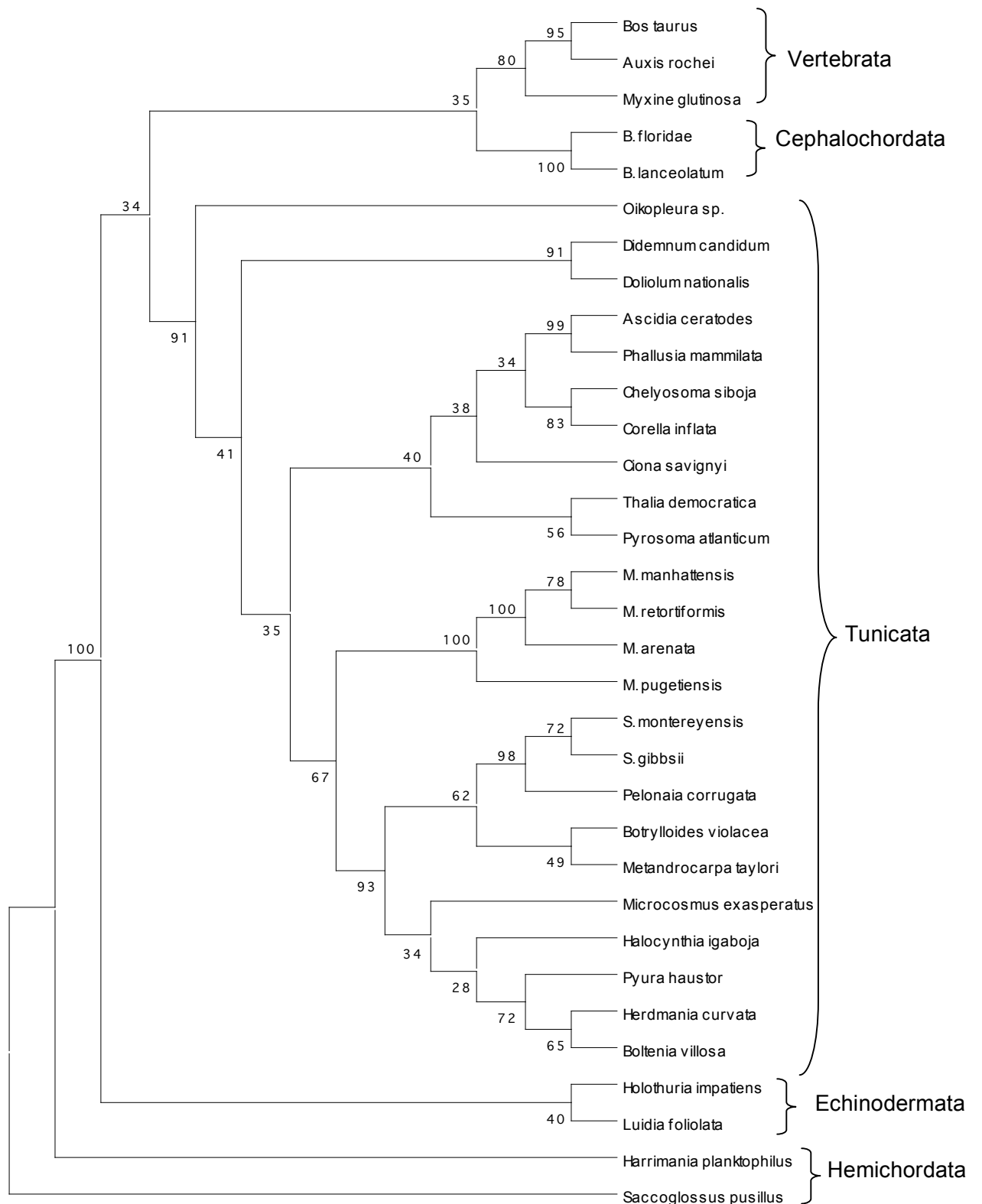


Figura 17- Cladograma obtido pelo método da máxima parcimônia para os deuterostômios estudados. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *boostrap* (1000 replicações).

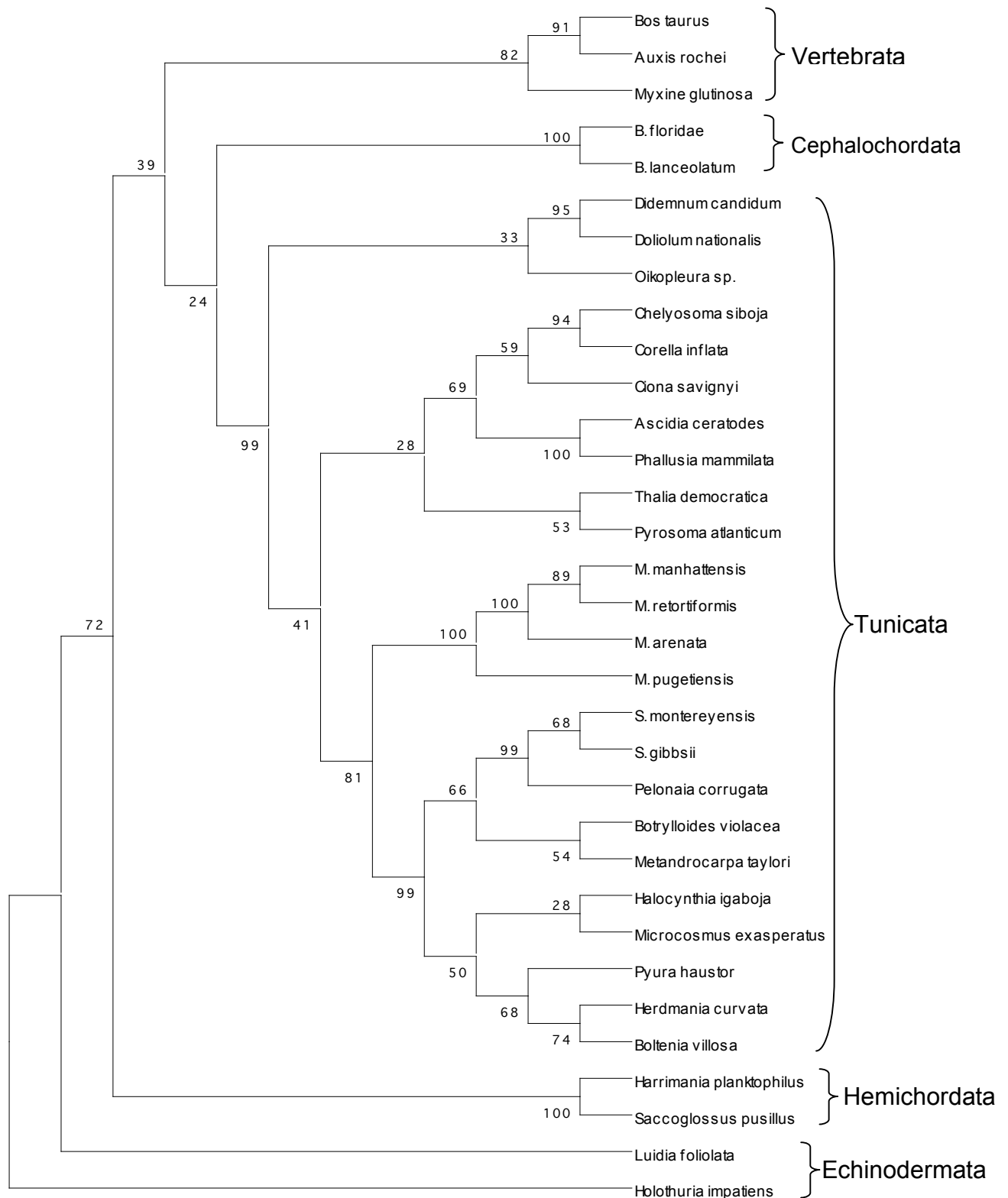


Figura 18- Cladograma obtido pelo método *Neighbor-joining* para os deuterostômios estudados, com *Holothuria impatiens* como grupo externo. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *boostrtrap* (1000 replicações).

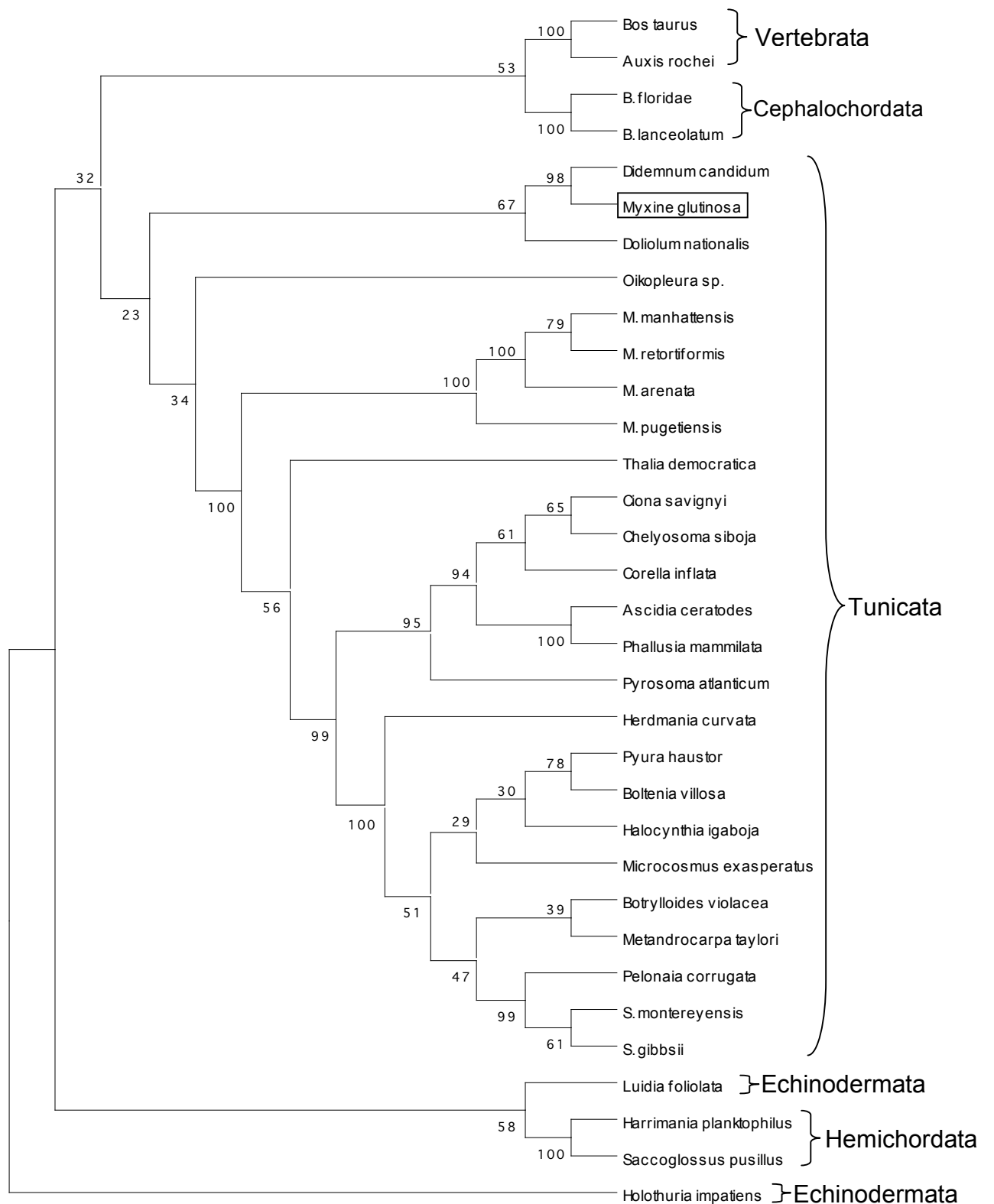


Figura 19- Cladograma obtido pelo método UPGMA para os deuterostômios estudados, com *Holothuria impatiens* como grupo externo. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *boostrap* (1000 replicações).

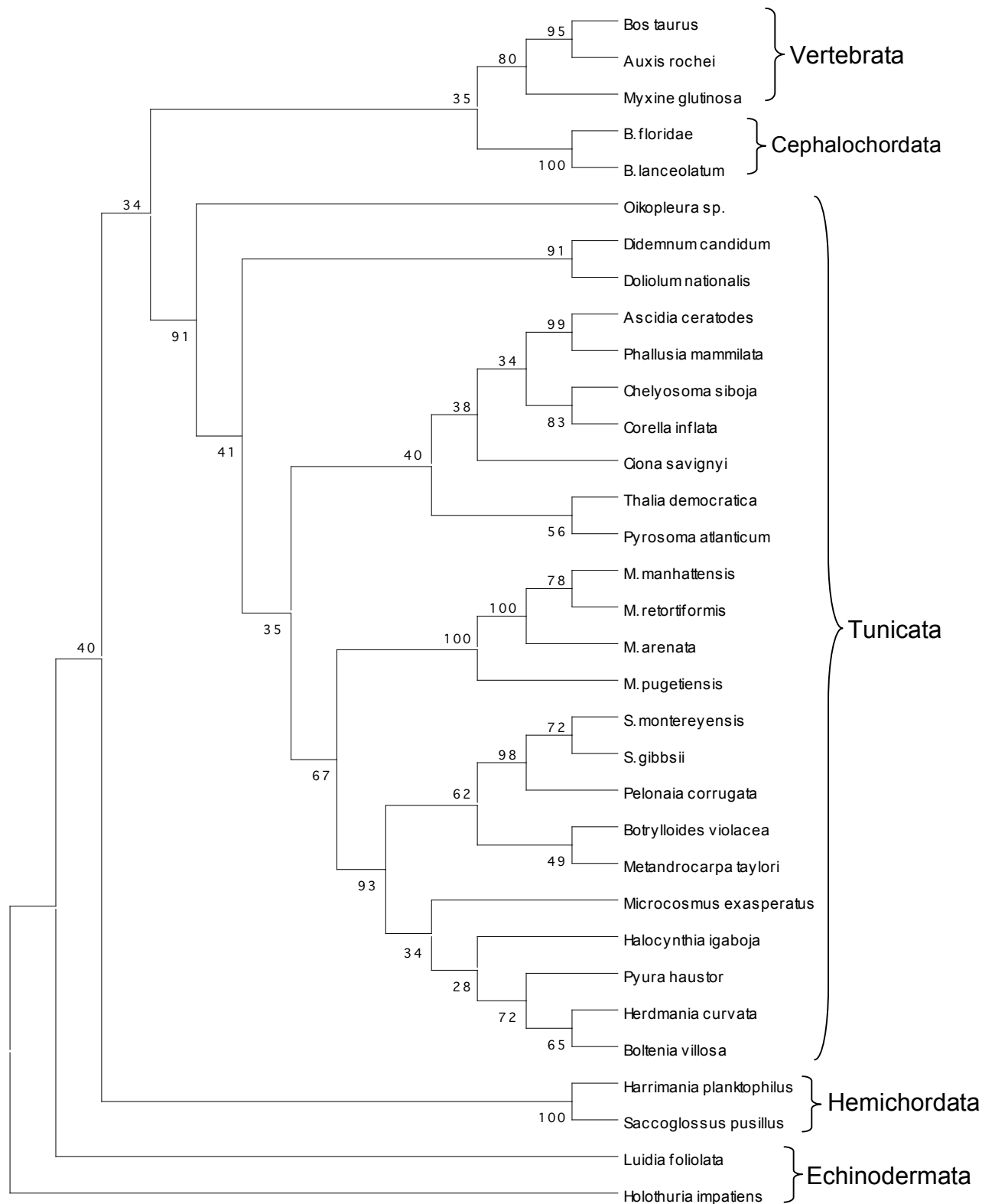


Figura 20- Cladograma obtido pelo método da máxima parcimônia para os deuterostômios estudados, com *Holothuria impatiens* como grupo externo. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *boostrtrap* (1000 replicações).

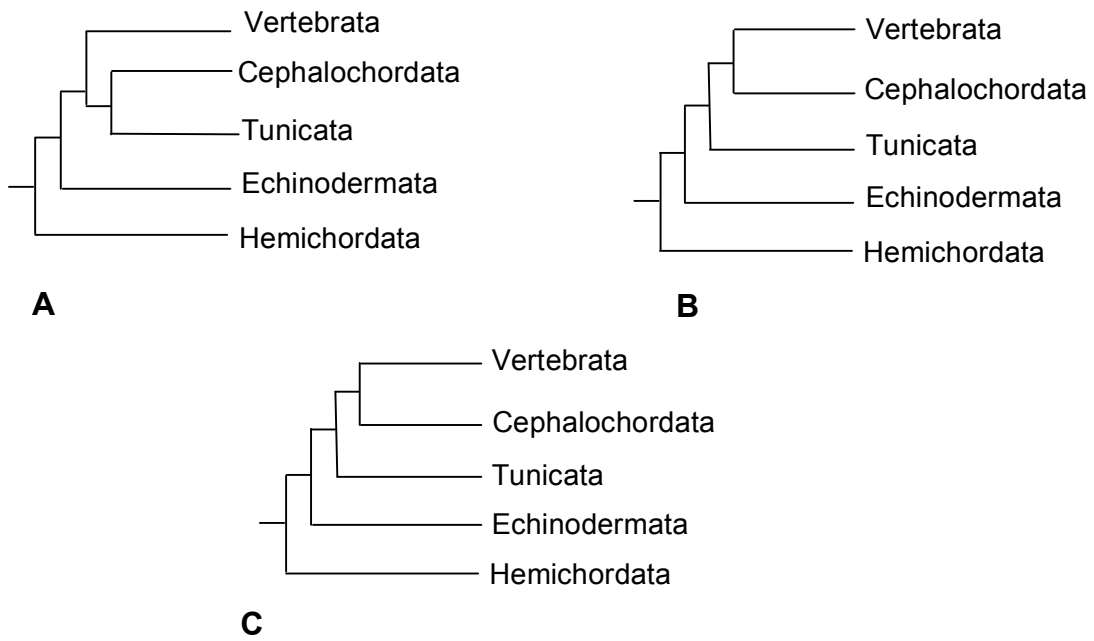


Figura 21- Árvores filogenéticas propostas para Ambulacraria + Chordata. **A**- método *Neighbor-joining*; **B**- método UPGMA; **C**- método da Máxima Parcimônia.

Cladogramas de Chordata

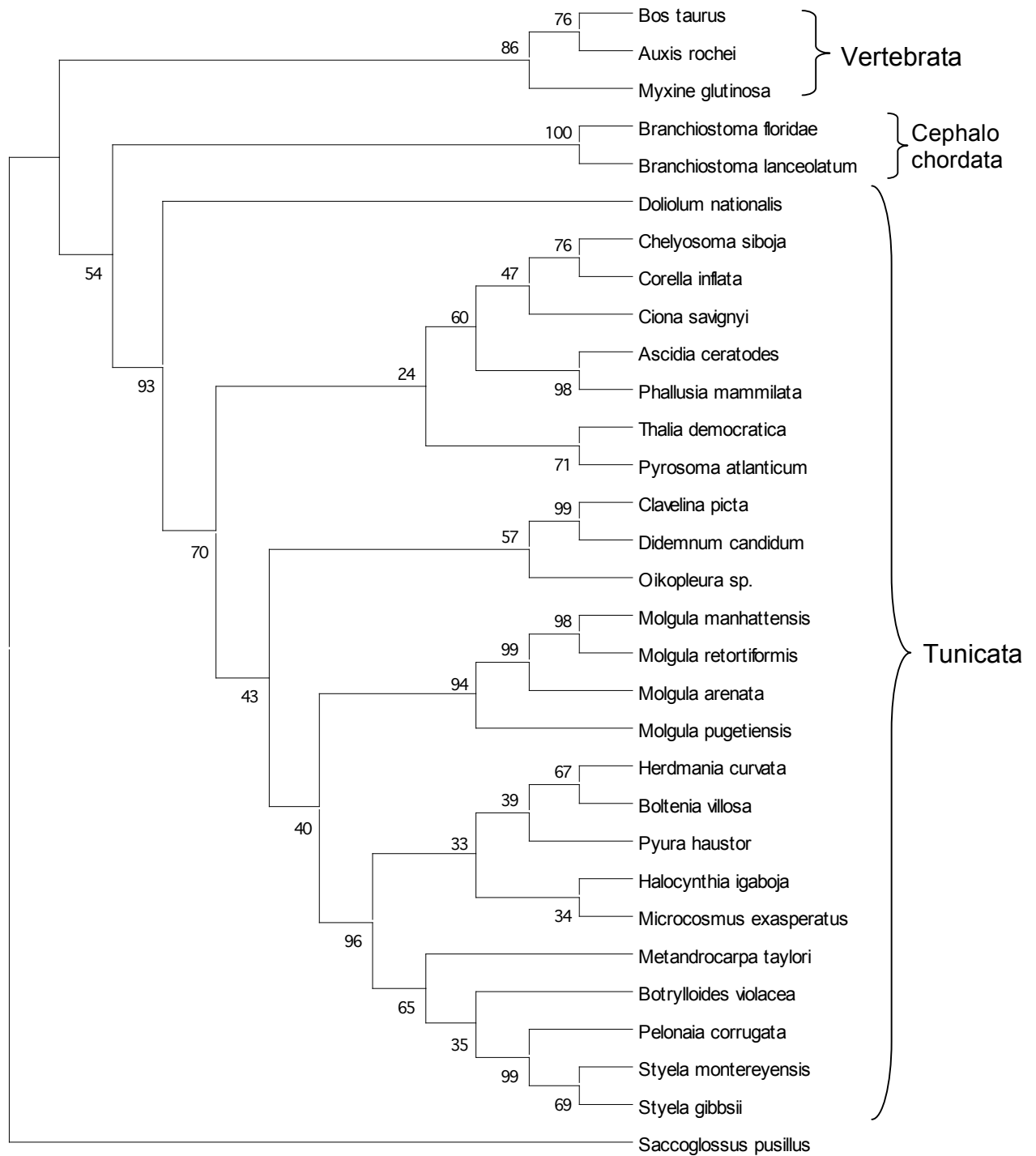


Figura 22- Cladograma dos Chordata obtido pelo método *Neighbor-joining*. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 replicações).



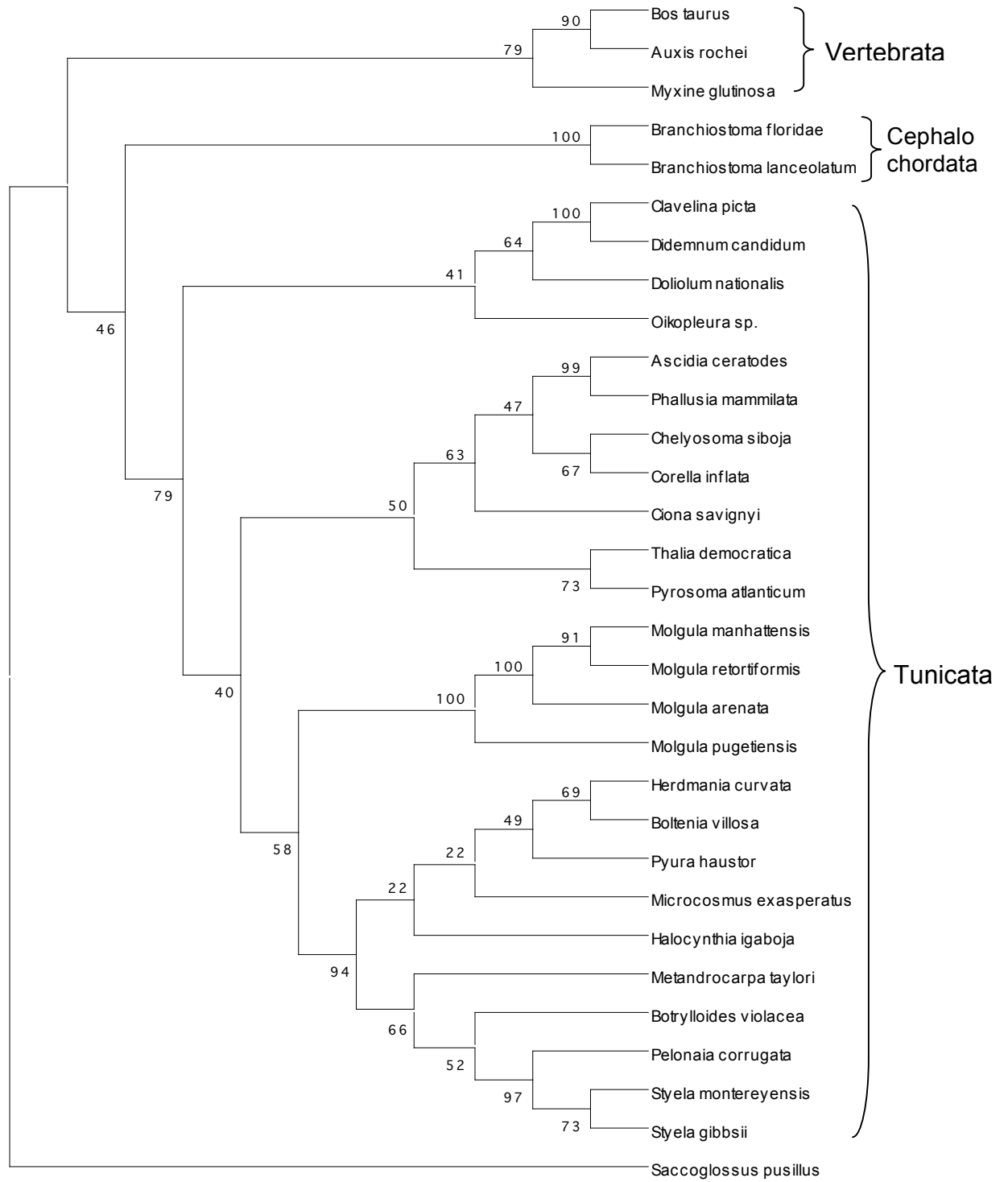


Figura 24- Cladograma dos Chordata obtido pelo método da máxima parcimônia. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *boostrap* (1000 replicações).

Cladogramas de Tunicata

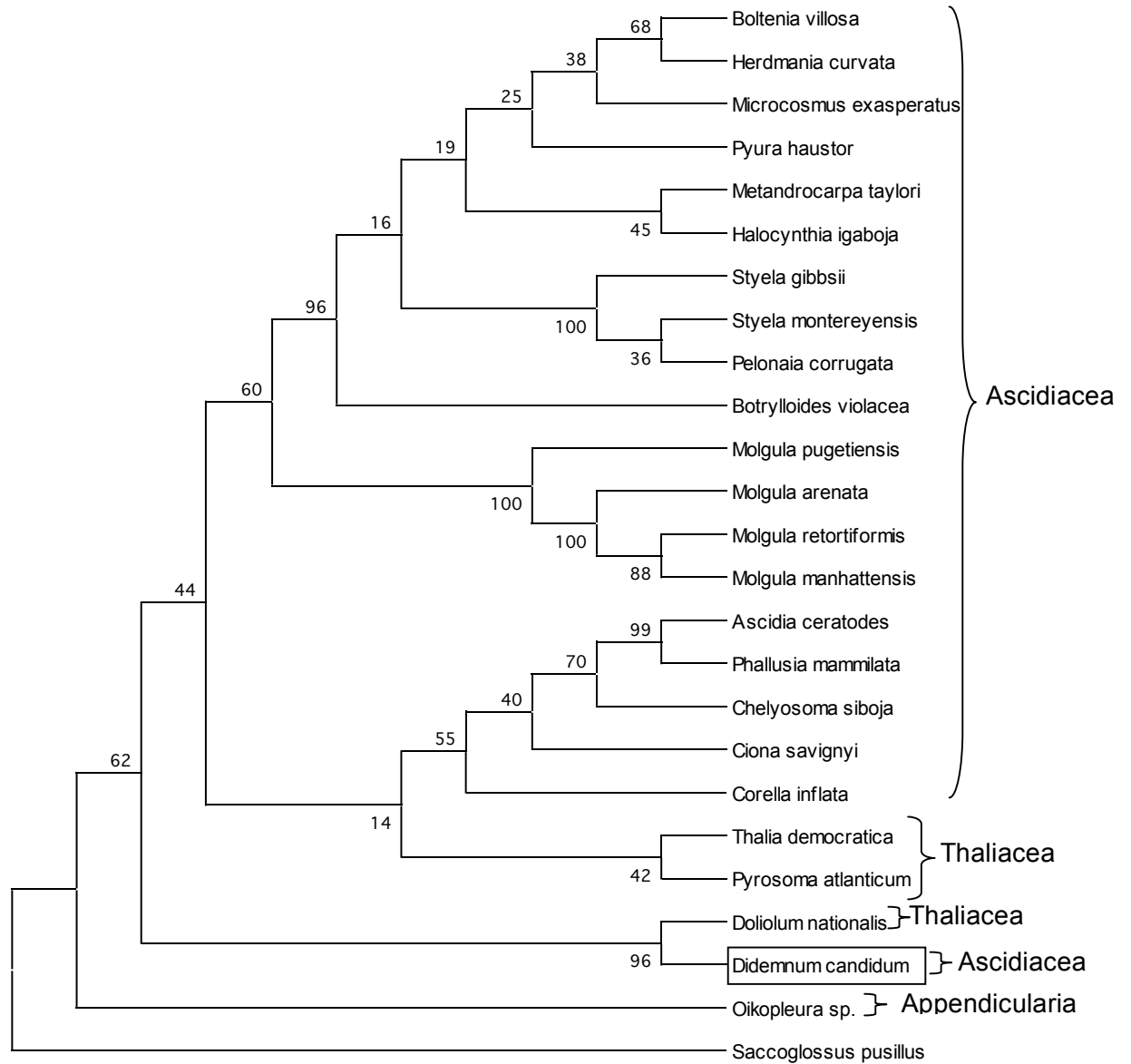


Figura 25- Cladograma para os Tunicata obtido pelo método do *Neighbor-joining*. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 replicações).

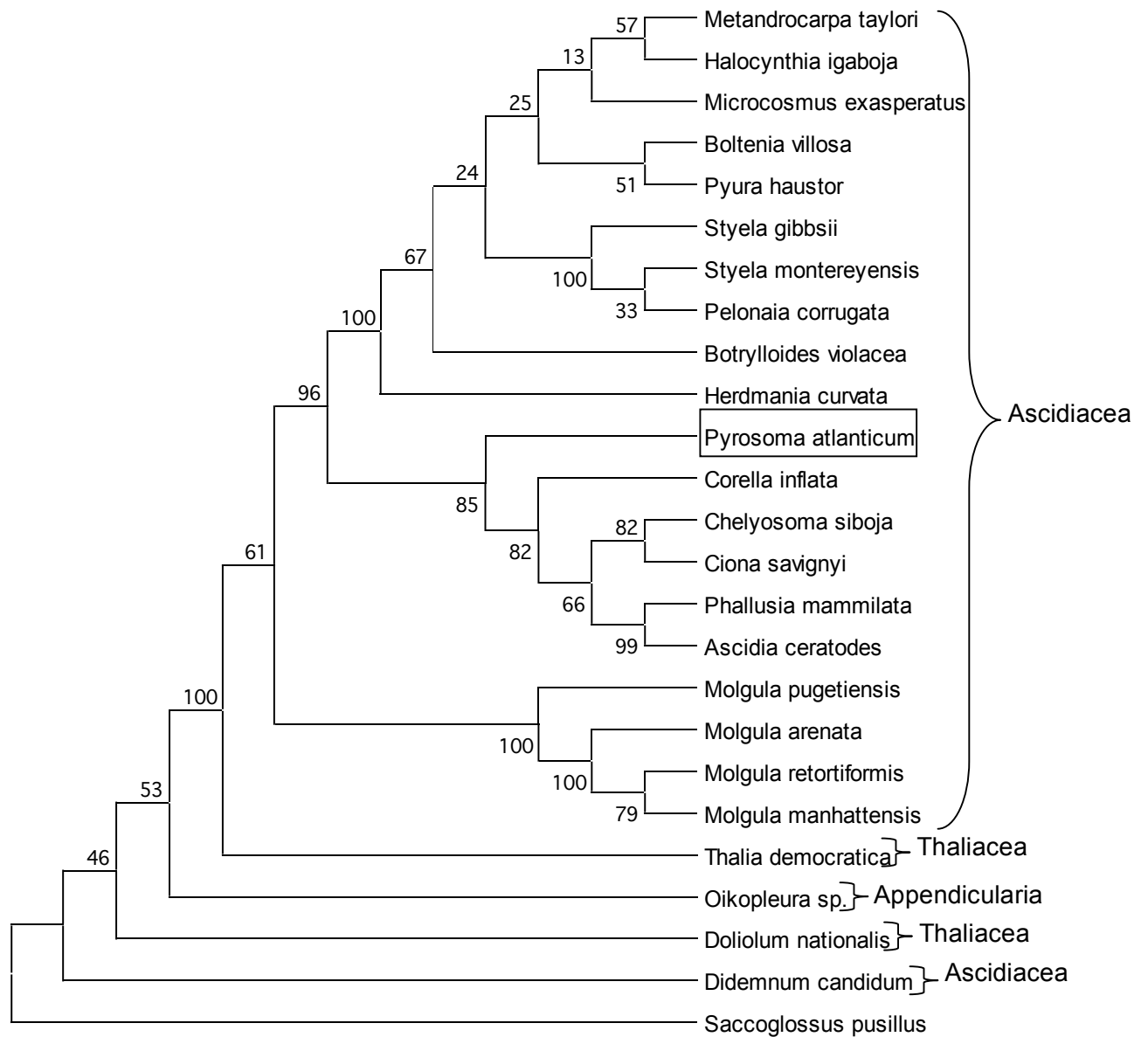


Figura 26- Cladograma para os Tunicata obtido pelo método UPGMA. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 replicações).

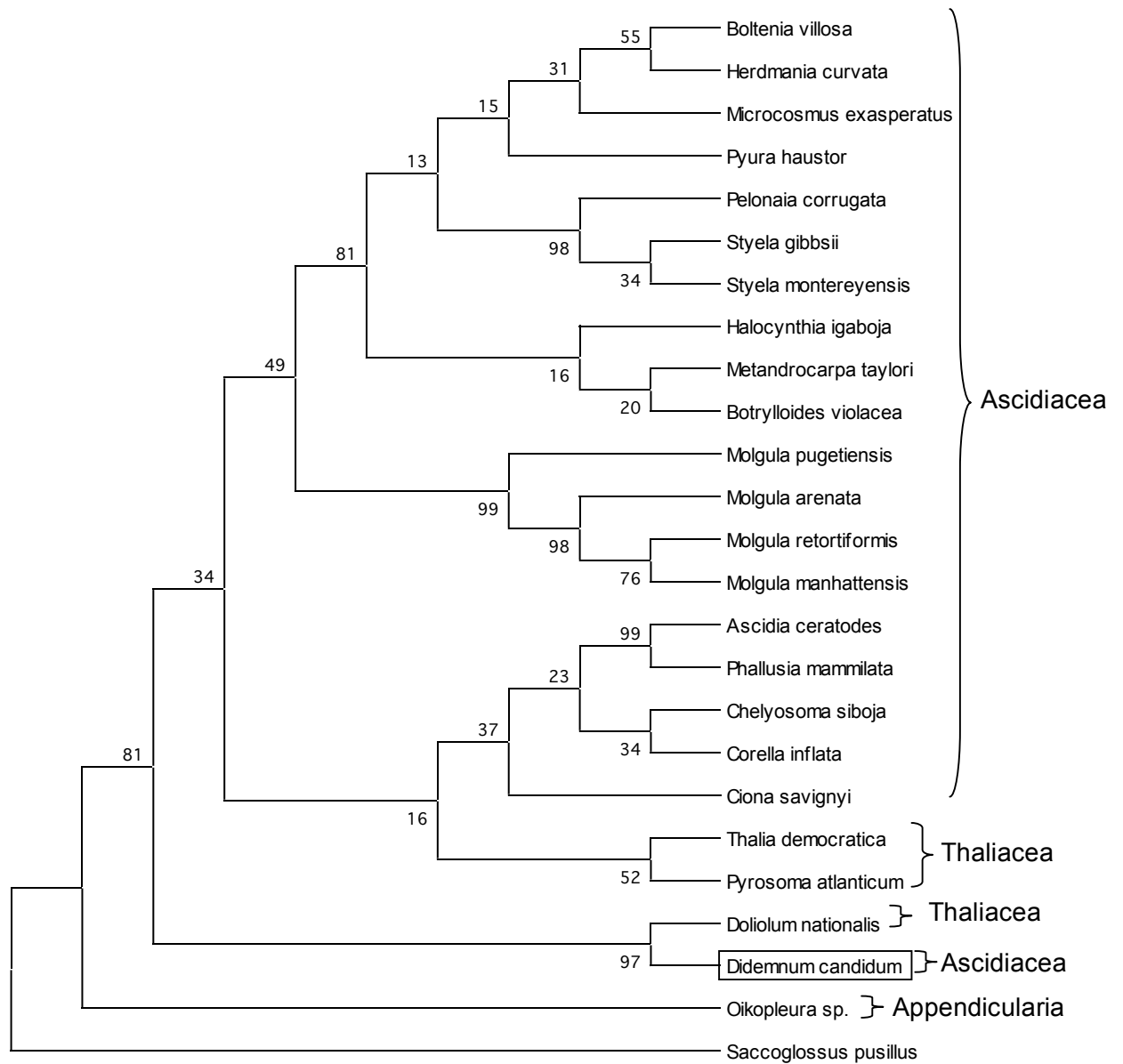


Figura 27- Cladograma para os Tunicata obtido pelo método da máxima parcimônia. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 replicações).

Cladogramas de Ascidiacea

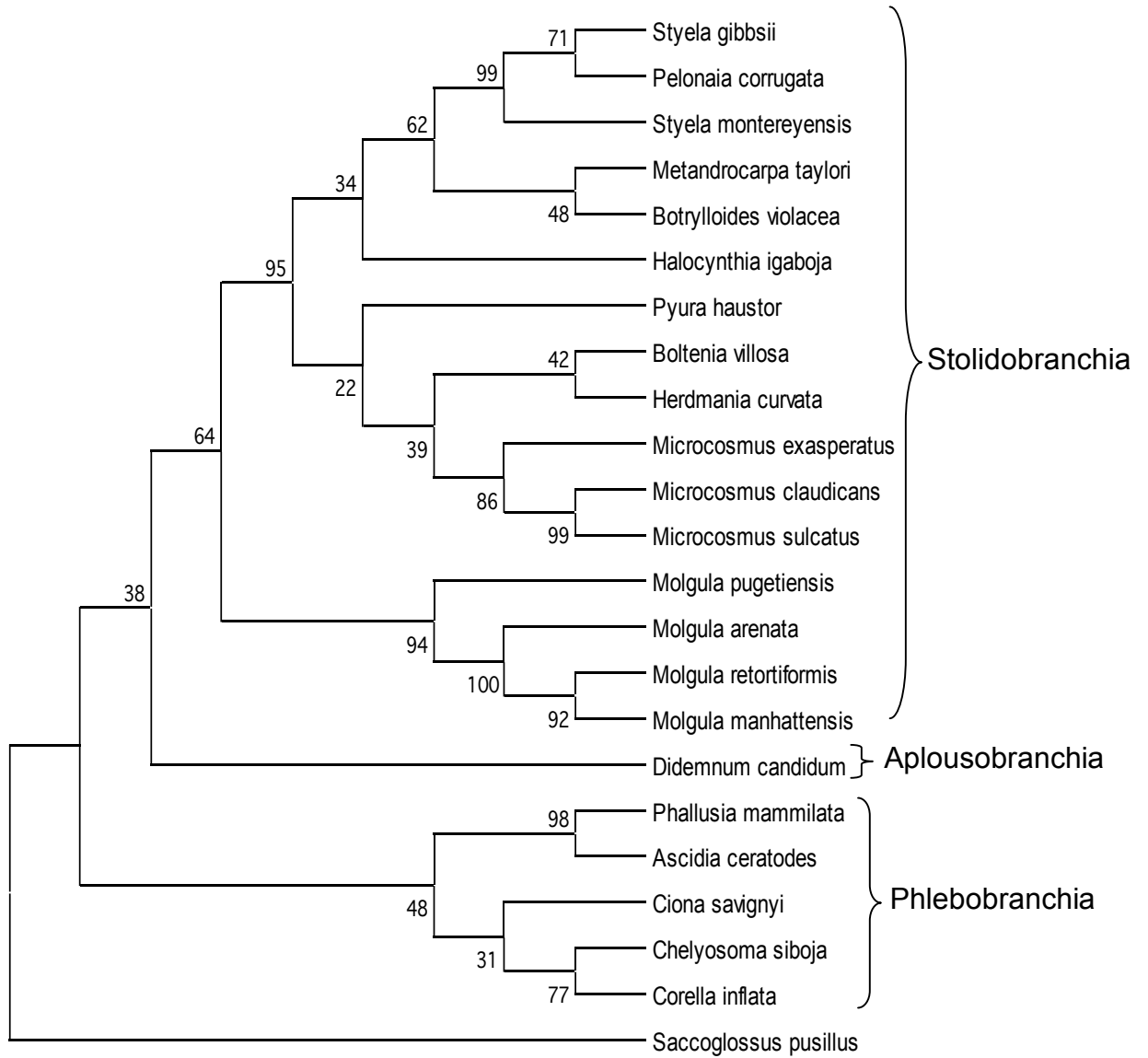


Figura 28- Cladograma obtido para os Ascidiacea pelo método *Neighbor-joining*. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 replicações).

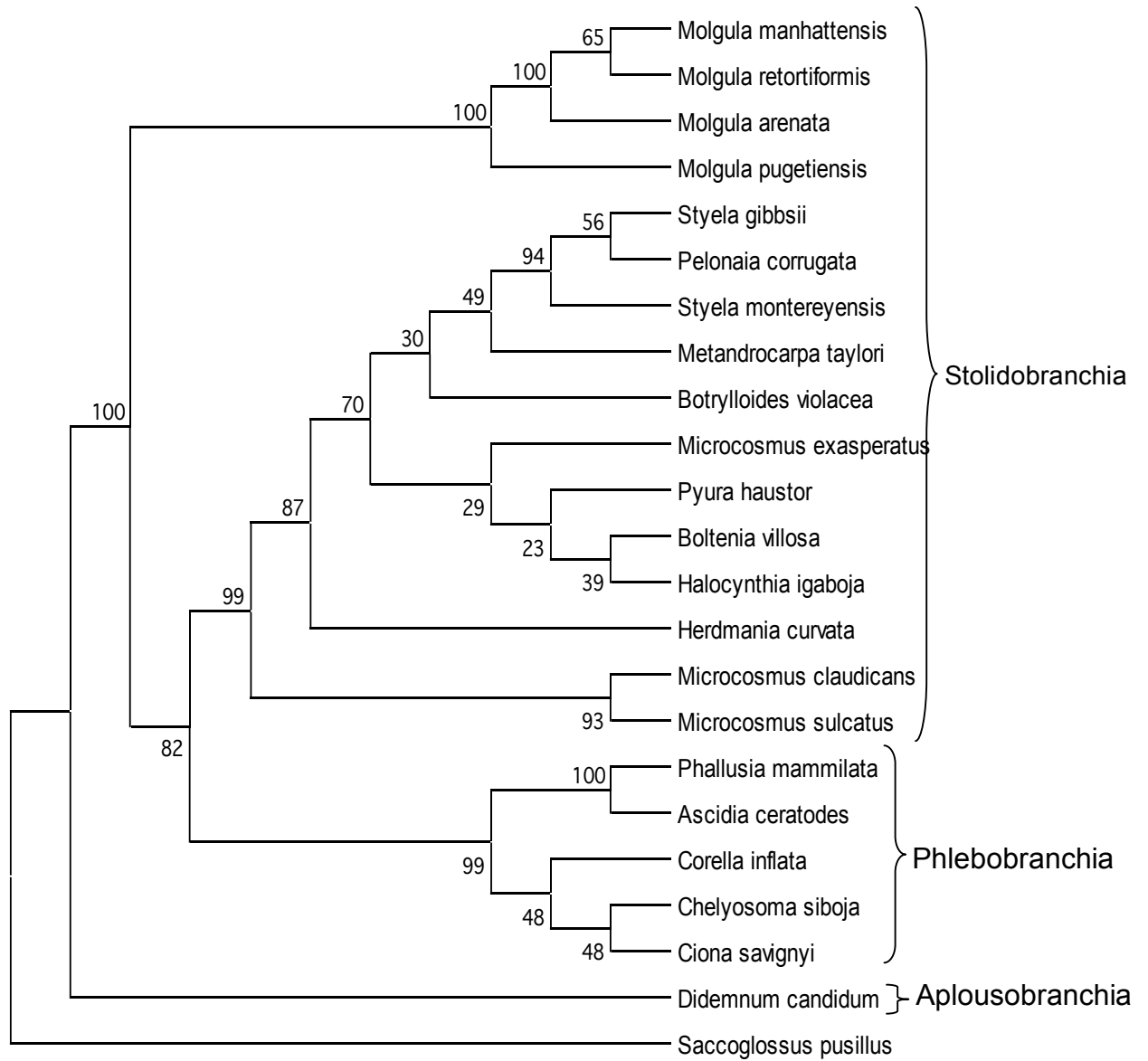


Figura 29- Cladograma obtido para os Ascidiacea pelo método UPGMA. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 replicações).

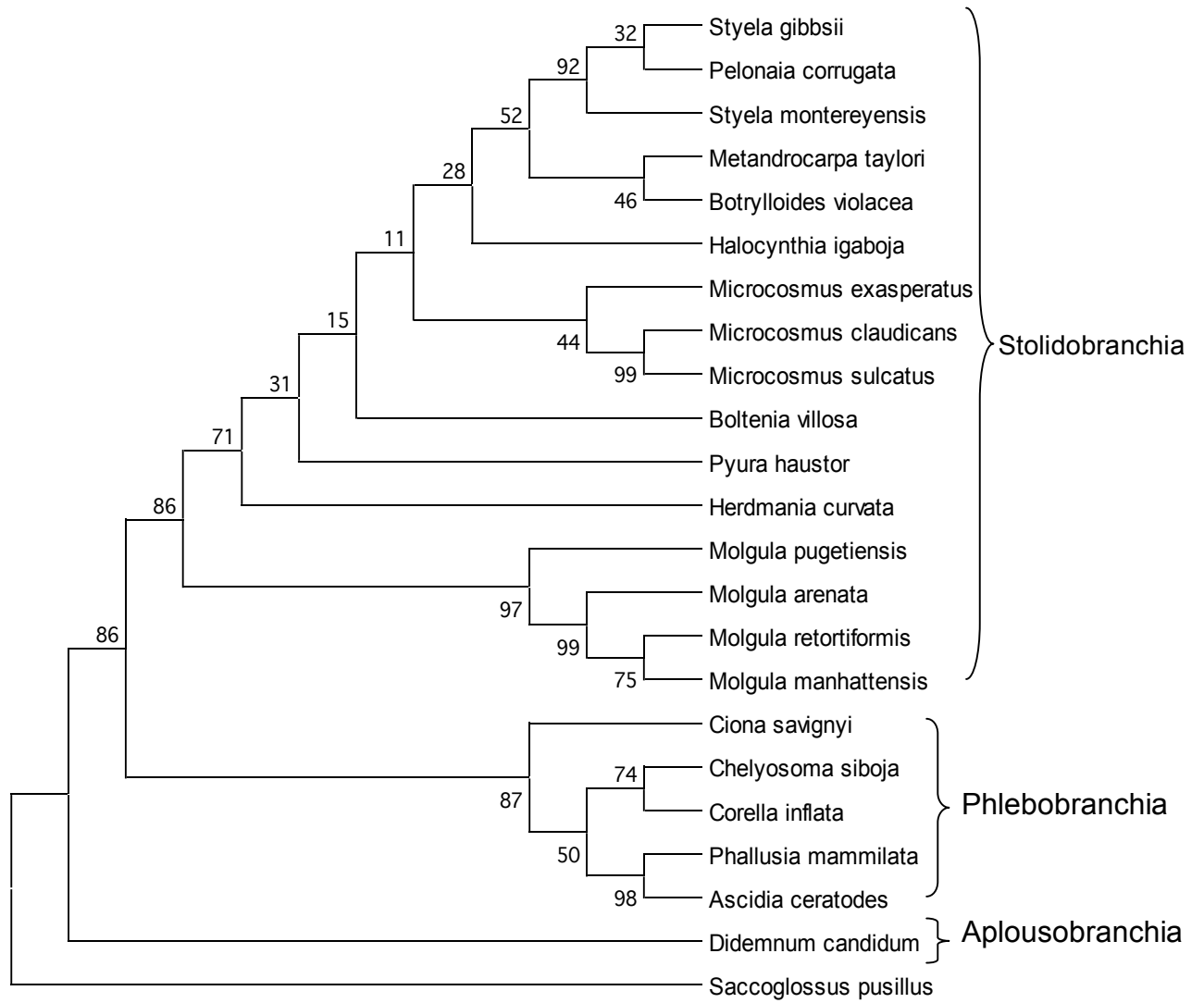


Figura 30- Cladograma obtido para os Ascidiacea pelo método da máxima parcimônia. Os números abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1000 replicações).

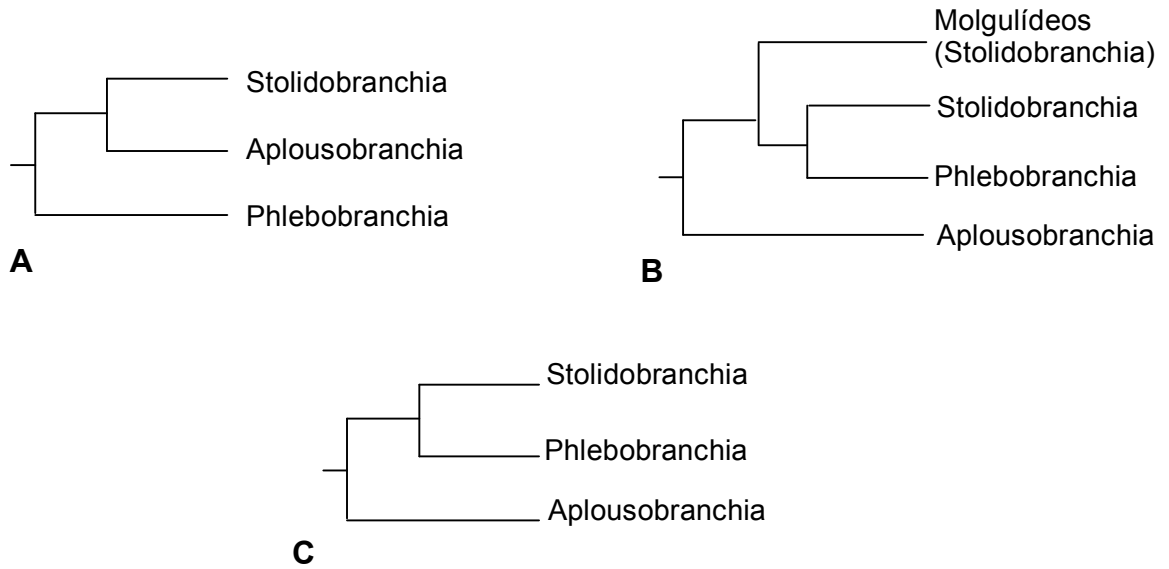


Figura 31- Árvores filogenéticas propostas para Ascidiacea. **A**- método *neighbor-joining*; **B**- método UPGMA; **C**- método da Máxima Parcimônia.

## **5- Discussão**

### **5.1- DNA genômico**

A realização de estudos moleculares com ascídias tem se mostrado difícil, uma vez que há a presença de componentes secundários associados ao seu DNA (COHEN et al., 1998), fornecendo na extração um DNA de qualidade inferior.

O uso de seqüências de DNA como caracteres geram uma grande quantidade de dados, mas a qualidade e quantidade do DNA extraído da espécie em estudo é que indica a viabilidade de estudos moleculares envolvendo ácidos nucléicos (LIMA, 2003).

Protocolo de extração de DNA genômico, similar ao utilizado neste estudo, baseado em reagente CTAB tem sido utilizado em diversos grupos, tais como plantas (WANG et al., 2005) e animais (VOLLMER & PALUMBI, 2004), dentre eles ascídias (COHEN et al., 1998). Entretanto, apesar de tais protocolos utilizarem o mesmo detergente, os métodos de extração e purificação de DNA freqüentemente sofrem modificações em suas técnicas, devido às particularidades bioquímicas de cada espécie (LIMA, 2003).

GROSBERG (1996), indica um protocolo de extração de DNA, que utiliza detergente CTAB, específico para ascídias. Este protocolo, contudo, carecia de certas informações quanto ao processo de obtenção de tal molécula, pois não designava qual a região e a quantidade de tecido que deveriam ser utilizadas para tal extração. Desta forma, no intuito de solucionar os problemas já descritos, foram testadas diferentes quantidades em gramas de animal fresco, a fim de se obter a quantidade de peso ótima para as análises subseqüentes de DNA e foram testadas também, diferentes regiões

do animal na tentativa de verificar qual delas produziria DNA de melhor qualidade. A partir dos dados obtidos (FIGURA 12) 0,3 gramas e a utilização de todo o animal foram os parâmetros que se mostraram mais eficientes para obtenção da molécula de DNA.

## 5.2- Região 18S

Como já citado anteriormente, as análises filogenéticas inferidas a partir de seqüências de DNA são obtidas analisando regiões conservadas nos táxons sob estudo (MEYER, 1997). Genes nucleares do DNA ribossômico dispõem de relativamente poucas variações nucleotídicas, principalmente nos seus menores níveis taxonômicos (COLEMAN & VACQUIER, 2002). Desta forma, pesquisas recentes têm dado seu enfoque à reconstrução de filogenias das principais linhagens de metazoários utilizando, para tanto, genes do nrDNA, principalmente 18S (PASSAMANECK et al., 2004), que de acordo com COHEN et al.(1998), também tem se mostrado apropriado para reconstrução da filogenia molecular das famílias de ascídias.

Muitas das moléculas de DNA dos organismos vivos apresentam comprimentos bastante extensos. Uma estratégia utilizada é fragmentar a molécula de DNA em pedaços menores, seqüenciar tais fragmentos e então unir os mesmos no intuito de restabelecer a molécula original (MOUNT, 2004).

Esse método foi o mesmo empregado no sequenciamento da região 18S do nrDNA de *M. exasperatus* (FIGURA 13), que resultou em um fragmento final de cerca de 1168 nucleotídeos (ANEXO 2).

Quanto ao conteúdo GC da espécie *M. exasperatus* o resultado obtido foi de 44%. Tal medida é definida como a porcentagem média de guaninas e

citiosinas na seqüência de DNA (NAHUM, 2001). Este mesmo autor indica que há duas hipóteses para explicar a presença de regiões ricas em G+C, uma delas indica que um alto valor de GC está relacionado a uma adaptação dos vertebrados a altas temperaturas. Outra hipótese indica que as diferenças na composição de bases seriam causadas por variações nos padrões de mutação.

De acordo com WINCHELL et al. (2002), os genes do nrDNA apresentam grande diversidade do conteúdo GC entre os organismos. Essa diferença pode ser melhor visualizada quando se relacionam diferentes grupos, pois espécies de tunicados apresentam baixos valores de G+C, assim como representantes protostômios. Contudo, o oposto ocorre quando são analisados peixes-bruxa e hemicordados. Isso indica que a partir da análise do conteúdo GC, os tunicados apresentam valores baixos de tal parâmetro, característica semelhante aos protostômios.

### 5.3- Saturação de bases e modelo de substituição nucleotídica

De acordo com PAGES & HOLMES (1998), quanto maior o número de substituições acumuladas entre duas seqüências, maior o número de modificações em sítios já anteriormente modificados, ou seja, maior o número de saturações. Desta forma, as substituições recentes tem pouco ou nenhum impacto no número total de diferenças entre duas seqüências, subestimando eventos evolutivos importantes que possam ter ocorrido desde a divergência inicial entre as seqüências (LIMA, 2003). No caso dos dados aqui abordados o fenômeno da saturação ocorre de forma linear, e por isso puderam ser utilizados.

Há uma grande diversidade de métodos utilizados para reconstruir filogenias, entretanto é necessário escolher o modelo de evolução do DNA que melhor se ajusta a cada conjunto de dados (SCHNEIDER, 2003). Uma maneira assegurar essa escolha se dá por meio da utilização do programa MODELTEST que utiliza o teste LTR para comparar diferentes modelos e escolher o mais apropriado. As árvores filogenéticas finais obtidas dependem dos modelos de substituição nucleotídica escolhidos, por isso para termos confiança no cladograma obtido é necessário também confiar no modelo escolhido (POSADA & CRANDALL, 1998).

No presente trabalho, o método de distância indicado pelo programa MODELTEST foi o modelo Tamura-Nei (1993), que leva em consideração o maior número de parâmetros (RUSSO et al., 2001), como a diferença na frequência de bases e atribuição de pesos maiores às transições (LIMA, 2003). Além disso, também foi incorporado o parâmetro da distribuição gama, o qual é capaz de incorporar heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica ao longo dos sítios, pois estes não evoluem a uma taxa constante (SCHNEIDER, 2003).

#### 5.4- Filogenias moleculares

Por muitos anos a filogenia de muitos grupos animais permaneceu obscura para os zoólogos (ALESHIN et al., 1998). Estudos procurando inferir as relações filogenéticas dos tunicados a partir de dados moleculares começaram a ganhar fôlego a partir da metade da década de 90 (SWALLA et al., 2000).

No caso dos cladogramas aqui obtidos, não há a presença de politomias, o que está de acordo com GRAUR & LI (1999), que indicam que em estudos evolutivos o processo de especiação é considerado binário, ou seja, em qualquer escala de tempo, a especiação leva a formação de apenas duas espécies a partir da espécie ancestral. Desse modo, para politomias em um cladograma há duas possíveis interpretações: na primeira hipótese se infere que a árvore realmente representa a filogenia verdadeira entre os táxons, ou seja, que uma espécie ancestral deu origem a mais de duas espécies simultaneamente ou então há a segunda interpretação, que indicam que filogenias com politomias representam o momento no qual a ordem exata das bifurcações não pode ser representada com fidelidade a partir dos dados disponíveis.

Um outro fato que é necessário salientar foi a escolha do *outgroup*, *Saccoglossus pusillus*, pois trabalhos anteriores utilizando seqüências de hemicordados e equinodermos conseguiram encontrar boas filogenias, as quais se refletiram em ramos curtos nas árvores filogenéticas finais (WADA & SATOH, 1994; WADA, 1998). Além disso, a utilização de um grupo externo muito distante do *ingroup* poderia causar um aumento nas homoplasias entre as espécies que compõe tanto o grupo interno, como o grupo externo (WINNEPENCKX et al, 1998).

Quanto aos valores de *bootstrap*, é importante ressaltar que não há entre os especialistas na área um consenso quanto ao valor mínimo significativo para expressar a confiabilidade de um nó. HILLIS E BULL (1993) propuseram valores de 70% de *bootstrap* como limiar de confiança. Entretanto, LI (1997) indicou que apenas valores de *bootstrap* superiores ou iguais a 95%

poderiam ser considerados significativos para propor um parentesco (SCHNEIDER, 2003).

### 5.5- Relações filogenéticas de Chordata + Ambulacraria

De acordo com WINCHELL et al. (2002), são comuns estudos relacionados à filogenia dos deuterostômios utilizando genes do rDNA, principalmente da região 18S. Isso é corroborado também por WADA et al. (1992), que indicam que seqüências 16-18S e 23-28S do DNA e RNA ribossômico propiciam marcadores moleculares úteis para avaliar as relações filogenéticas do reino animal.

A partir dos cladogramas construídos neste trabalho com o intuito de identificar as relações de parentesco entre Chordata e Ambulacraria (FIGURAS 15 a 20), Chordata mostrou ser um táxon monofilético, como indicado por TUBERVILLE et al. (1994) e WINCHELL et al. (2002). No entanto, isto não está de acordo com os dados obtidos por DELSUC et al. (2006), que indicam que tal filo não poderia ser monofilético, pois ocorreu agrupamento de representantes de Cephalochordata no grupo dos equinodermos.

Além de Chordata ter se mostrado monofilético, os subfilos que o compõem também o são, assim como Echinodermata (FIGURA 15 e 17) e Hemichordata (FIGURA 18 e 20).

Um cenário indicado pelos cladogramas *neighbor-joining* (FIGURA 15 e 18) é a formação do clado unindo Tunicata e Cephalochordata, mostrando que os representantes de tais táxons são mais proximamente aparentados entre si do que com os vertebrados (FIGURA 21A), o que está de acordo com GISSI et al. (2004) que indicam uma maior similaridade da composição do DNA

mitocondrial de cefalocordados e tunicados. Contudo, os cladogramas produzidos a partir dos métodos UPGMA (FIGURA 16 e 19) e máxima parcimônia (FIGURA 17 e 20) contradizem esses dados, indicando que Vertebrata e Cephalochordata formam um clado irmão de Tunicata (FIGURA 21B e 21C).

A partir da análise de 146 genes nucleares, DELSUC et al. (2006) contrapõem todos os cenários aqui obtidos indicando uma forte afinidade filogenética entre tunicados e vertebrados. Tais autores afirmam ainda que há trabalhos utilizando dados morfológicos e do RNA ribossômico que chegaram aos mesmos resultados por eles obtidos, propondo assim um novo clado denominado Olfatores para unir tais táxons.

Um dos motivos que pode ter levado à obtenção de cenários evolutivos tão discrepantes pode estar relacionado à elaboração de árvores filogenéticas a partir de diferentes regiões do DNA (RUSSO et al., 1995) ou ao número de genes utilizados no estudo, pois de acordo com DELSUC et al. (op. cit.) filogenias baseadas em poucos ou em um único gene levam a erros estatísticos que podem mascarar resultados, levando a hipóteses incorretas.

## 5.6- Relações filogenéticas dos Chordata

Com relação aos cladogramas em que se utilizou apenas as espécies de cordados (FIGURAS 22 e 24), pode-se notar a monofilia de todos os grupos que fazem parte do filo Chordata: Vertebrata, Cephalochordata e Tunicata. Entretanto, isso não foi observado no cladograma construído a partir do método UPGMA (FIGURA 23), que indicou a parafilia de muitos táxons, apesar da presença do táxon monofilético Cephalochordata.

Quanto ao grupo Vertebrata, o clado formado por *Bos taurus* e *Auxis rochei* mostrou-se presente nos três cladogramas produzidos, variando apenas seus índices de confiabilidade (76%, 90% e 100%). No cladograma obtido pela topologia UPGMA, *Myxine glutinosa*, um outro representante do mesmo subfilo, formou um clado conjunto com as ascídias aplousobranquias. Isso pode ter ocorrido pelo fato do algoritmo UPGMA se basear em similaridade total, apresentando com isso um melhor desempenho para conjuntos de dados em que as taxas de substituição não variam muito de uma linhagem para outra (RUSSO et al., 2001).

O subfilo Cephalochordata, representado pelas espécies *Branchiostoma floridae* e *B. lanceolatum*, se mostrou monofilético em todos os cladogramas apresentados. Além disso, tal clado obteve uma porcentagem de confiabilidade de 100%, indicando que de fato o agrupamento pode ser considerado confiável, pois segundo NEI & KUMAR (2000) valores de bootstrap entre 95 e 99% são considerados elevados e desse modo a topologia é considerada significativa.

Um outro ponto de divergência entre os estudiosos está relacionado ao táxon Tunicata, pois alguns acreditam que tal grupo teria uma posição basal em Chordata (WADA et al., 1992). Outros consideram os tunicados como cordados derivados, com modos de desenvolvimento e estilos de vida altamente especializados (DELSUC et al., 2006). GISSI et al. (2004) argumentam que o genoma das ascídias é muito peculiar, sendo extremamente divergente de Chordata, sendo por isso proposto por ZENG & SWALLA (2005) como um grupo a parte. Contudo, essa visão não é comum a todos os pesquisadores, pois DELSUC et al. (2006) acreditam que mesmo com a

deficiência de elementos morfológicos/sistemáticos que agrupem vertebrados e tunicados, estes são filogeneticamente muito próximos.

### 5.7- Relações filogenéticas dos Tunicata

De acordo com WOLLSCHIED & WÄGELE (1999), já existem vários trabalhos que tratam da filogenia de invertebrados utilizando seqüenciamento de DNA. Dessa forma, a filogenia molecular é uma forma de proporcionar dados complementares às relações de parentesco propostas com base em morfologia, paleontologia e anatomia, entre outros (GRAUR & LI, 1999). Além disso, segundo BROWN (2000) a comparação entre seqüências é o método mais confiável e poderoso para responder questões sobre as relações evolucionárias entre os táxons. Contudo, com relação ao subfilo Tunicata, as relações entre os grupos que o compõe se mostram ainda bastante incertas (ZENG & SWALLA, 2005).

O grupo Tunicata, segundo STACH & TUBERVILLE (2002), é um táxon monofilético, o que pode ser também evidenciado pelos cladogramas aqui obtidos (FIGURA 15,17,18, 20, 22 e 24). Além disso, de acordo com WADA (1998) e SWALLA et al., (2000), Appendicularia foi o primeiro táxon a divergir na história evolutiva do mesmo. Isto é corroborado pelos cladogramas construídos a partir dos modelos *neighbor-joining* (FIGURA 25) e máxima parcimônia (FIGURA 27), que indicam *Oikopleura sp.* como grupo irmão do restante dos tunicados. Por outro lado, STACH & TUBERVILLE (2002) indicam que Appendicularia só é caracterizado como grupo basal de Tunicata na ausência de seqüências de representantes de Aplousobranchia e que estudos

por eles realizados com base em análises moleculares e dados morfológicos os unem como grupos irmãos.

Nos cladogramas aqui obtidos foram utilizados representantes dos dois grupos (Appendicularia e Aplousobranchiata) e mesmo assim o primeiro foi identificado como grupo basal e não houve reunião dos mesmos em um clado comum.

Ainda com relação aos Appendicularia, os representantes de tal táxon apresentam elevadas taxas evolutivas quando os comparamos com o restante dos tunicados, o que pode levar à formação do fenômeno de *long branch attraction*. Entretanto, quando se adicionam novos táxons às filogenias, no intuito de minimizar tal problema, o que se observa é a formação de um clado que une este grupo aos Stolidobranchia (ZENG & SWALLA, 2005), algo que não foi visualizado em nenhum dos cladogramas aqui obtidos.

Apesar de Appendicularia, se caracterizar como monofilético (STACH & TUBERVILLE, 2002), não foi possível fazer inferências sobre as relações de parentesco dos representantes do mesmo, já que apenas uma única seqüência (*Oikopleura sp.*) foi utilizada na análise, devido à carência de seqüências 18S do nrDNA das espécies pertencentes a este táxon.

De acordo com SWALLA (2001), Thaliacea parece ter desenvolvido seu estilo de vida planctônico a partir de ascídias adultas, tendo evoluído a partir de representantes flebobrânquios, e considerados os tunicados mais derivados (ZENG & SWALLA, 2005). Tal fato está de acordo com os dados obtidos nas figuras 25 e 27 que mostram um clado formado pelo táxon Phlebobranchia juntamente com alguns representantes de Thaliacea.

Um outro ponto a ser abordado com relação ao táxon Thaliacea, é que este se mostrou parafilético para todos os cladogramas formados, dado corroborado por WADA (1998), mas oposto ao indicado por STACH & TUBERVILLE (2002).

Estes mesmos autores notaram ainda que o clado formado por Thaliacea e Phlebobranchiata era grupo irmão de Stolidobranchiata, o que corresponde aos cladogramas 25 e 27. Além disso, eles indicaram conflitos no agrupamento de representantes de Thaliacea, o que foi visualizado nos cladogramas aqui encontrados, pois apesar de *Thalia democratica* e *Pyrosoma atlanticum* formarem um clado único nos cladogramas obtidos pelos métodos MP e NJ, *Doliolum nationalis* nunca foi incluído nesse grupo, estando sempre próximo de *Didemnum candidum*, um ascidiáceo representante de Aplousobranchiata (FIGURA 26 e 28).

Ainda a cerca dos taliáceos, nos cladogramas 25 e 27, Salpidae e Pyrosomidae formaram um clado único, o que é corroborado por STACH & TUBERVILLE (2002) para dados moleculares, mas está em desacordo com estes mesmos autores quando análises morfológicas são utilizadas, indicando que as famílias Doliolidae e Salpidae são grupos mais próximos.

Quanto a Ascidiacea, assim como Thaliacea, os dados obtidos mostraram parafiletismo, fato já indicado em trabalhos anteriores (WADA, 1998).

### 5.8- Relações filogenéticas dos Ascidiacea

De acordo com SWALLA (2001), há diferentes sistemas taxonômicos para classificar as ascídias, sendo os caracteres morfológicos como a posição e estrutura das gônadas e características envolvendo a cesta branquial os mais

comuns. Esta mesma autora relata ainda que a reconstrução de filogenias utilizando genes do rDNA e do rRNA sugerem a formação de três táxons: Aplousobranchia, Phlebobranchia e Stolidobranchia, o que está de acordo com os cladogramas obtidos pelos métodos *neighbor-joining* (FIGURA 28) e de máxima parcimônia (MP) (FIGURA 30). Entretanto, o cladograma obtido pelo método UPGMA (FIGURA 29) não confirma este cenário. Esta discrepância entre os cladogramas pode estar relacionada a uma característica do método UPGMA, que depende que a taxa de evolução das seqüências analisadas seja constante, ou seja, que a taxa de substituição se mantenha a mesma por toda a filogenia (RUSSO et al., 2001).

O fenômeno da heterogeneidade nas taxas de evolução é bastante comum e encontrado em diversos estudos evolutivos que se baseiam na análise de moléculas (MYIAKI et al., 2001). Segundo DELSUC et al. (2006), essa variação ocorre nas taxas evolutivas dos tunicados, o que foi identificado também por SWALLA et al. (2000) para Ascidiacea, que parece apresentar tais variações tanto dentro das famílias como entre estas. Deste modo, o método UPGMA não pode ser considerado o melhor modelo de construção de topologias para os tunicados.

Quanto aos cladogramas de Ascidiacea (FIGURAS 28, 29 e 30) é possível identificar três possíveis cenários que explicariam as relações de parentesco de tal táxon. O primeiro indica um clado formado por Aplousobranchia e Stolidobranchia, com valores de *bootstrap* de 36%. Já o método UPGMA (FIGURA 31B) indica o táxon Molgulidae como um grupo irmão do clado que une Stolidobranchia e Phlebobranchia e o método MP (FIGURA 31C) apresenta Aplousobranchia como grupo irmão de

Stolidobranchia + Phlebobranchia, com valores de confiança de 86%, o que está de acordo com TURON & LÓPEZ- LEGENTIL, (2004), mas contrapõe a classificação das ascídias em Pleurogona e Enterogona, como suportado por WADA et al. (1992) e indicado para explicar a variação na composição nucleotídica da região 18S do nrDNA.

De acordo com STACH & TUBERVILLE (2002) Aplousobranchia é o grupo de ascídias mais basal, dado também observado a partir dos cladogramas aqui obtidos (FIGURA 29 e 30). Além disso, estes mesmos autores indicam que este é grupo irmão dos Appendicularia. Entretanto, ZENG & SWALLA (2005) contestam tal dado, indicando que a região 18S do nrDNA das ascídias aplousobranquias se mostra bastante distinto do restante dos Ascidiacea, propiciando deste modo um agrupamento errôneo de tal táxon. Nos cladogramas aqui obtidos (FIGURAS 25 e 27), *Didemnum candidum* formou um clado com *Doliolum nationalis*, um representante de Thaliacea, contestando portanto os resultados de STACH & TUBERVILLE (2002).

Ainda com relação a Aplousobranchia, este grupo formou um clado monofilético com elevados valores de bootstrap (FIGURA 19, 20 e 21), fato corroborado por STACH & TUBERVILLE (2002). Entretanto, não foi possível nos cladogramas subsequentes deixar mais que uma seqüência dos representantes de tal táxon, pois as seqüências referentes à região 18S do nrDNA depositadas no GenBank apresentam-se muito diferentes das seqüências dos organismos que compõem o grupo Ascidiacea, fato este observado por SWALLA (2001) que, tendo seqüenciado a região 18S do nrDNA de diversos aplousobranquios, encontrou dificuldades no seu alinhamento, pelo fato destas seqüências apresentarem diversos eventos de

inserção que impediam um alinhamento ótimo. Quando utilizamos seqüências muito discrepantes para obtenção de uma árvore filogenética, o alinhamento entre estas se torna muito difícil, acarretando em diversos erros que, mesmo utilizando editores para a correção dos mesmos, é praticamente impossível alcançar um bom alinhamento.

Um outro problema envolvendo seqüências de organismos do táxon Aplousobranchia é que o grande número de inserções pode indicar uma alta taxa de evolução das mesmas, o que pode levar ao artefato de atração dos ramos (*long branch attraction*) (DELSUC et al., 2006), acarretando na formação de uma árvore filogenética irreal.

Quanto ao táxon Phlebobranchia, foi observado em todos os cladogramas um único clado unindo todos os seus representantes, indicando assim, tratar-se de um grupo monofilético, o que é corroborado por STACH & TUBERVILLE (2002).

De acordo com KOTT (1990), baseando-se em análises de dados morfológicos, Cionidae deveria ser retirado de Phlebobranchia e incluído em Aplousobranchia. Essa autora coloca como evidências dos parentesco dos Cionidae com os demais Aplousobranchia características como o estado majoritário de oxidação do Vanádio e um epicárdio com papel regenerativo. Contudo, este cenário é completamente discrepante dos cladogramas aqui apresentados, que colocam *Ciona savignyi* no clado comum a todos os representantes de Phlebobranchia, indicando tratar-se de mais um representante deste grupo. Certamente esta discrepância na classificação de Cionidae está relacionada ao fato destes estudos anteriores não se basearem nos princípios da sistemática filogenética.

Ainda com relação ao táxon Phlebobranchia, é possível identificar um clado que se repetiu nos três cladogramas unindo as espécies *Phallusia mammilata* e *Ascidia ceratodes*. Tal clado apresenta elevados valores de *bootstrap*, que variaram de 98% a 100%, indicando um elevado grau de parentesco entre os táxons, o que é corroborado pela classificação atual que agrupa tais organismos na família Ascidiidae.

*Corella inflata* e *Chelyosoma siboja* pertencem à família Corellidae formando um grupo irmão com *Ciona savignyi* nos cladogramas obtidos por *neighbor-joining* e MP (FIGURA 28 e 30), que apresentaram significativos valores de *bootstrap*. As relações de parentesco se mostraram diferentes quando analisamos o cladograma construído pelo método UPGMA, pois é possível visualizar um clado formado por *C. savignyi* e *C. siboja*, pertencentes a duas famílias distintas na classificação de Ascidiacea, quando baseada em características morfológicas. Como já foi mencionado, o método UPGMA não mostrou-se adequado para as inferências filogenéticas aqui trabalhadas, mesmo quando altos valores de *bootstrap* são observados. De acordo com WADA (1998), há vários casos em que uma topologia errada é suportada por elevados índices de confiabilidade.

Com relação ao grupo Stolidobranchia, foi observado seu monofiletismo em diversos cladogramas (FIGURA 15, 17, 19, 21, 22, 24, 25 e 27). Apesar disso, ainda são incertas as relações de algumas famílias pertencentes a este táxon, pois não há monofiletismo evidente nem para a família Styelidae, nem para Pyuridae, o que também foi indicado por SWALLA et al. (2000). Contudo o táxon Molgulidae apresenta-se como uma exceção, pois foi observado um grupo monofilético unindo os representantes desta

família em todos os cladogramas obtidos, sendo este o grupo mais basal dos stolidobranquios. Tal fato também foi evidenciado por STACH & TUBERVILLE (2002) e ZENG & SWALLA (2005).

O monofiletismo de Molgulidae nos cladogramas aqui obtidos não foi uma surpresa, já que mesmo durante o alinhamento e edição das seqüências era possível notar que as espécies desse gênero apresentam regiões nas suas seqüências de DNA muito similares entre si, mas que muitas vezes diferem da composição nucleotídica dos demais ascidiáceos. Baseado nessa característica nucleotídica incomum, além de dados morfológicos únicos, ZENG & SWALLA (2005) indicam que tal táxon deveria ser classificado como uma ordem diferenciada de ascídias, não constituindo, portanto, apenas uma família. Ainda com relação a este grupo, SWALLA et al. (2000) acreditam que se trata de um táxon que apresenta altas taxas de evolução, representando um grupo de expansão mais recente.

Quanto às espécies do gênero *Microcosmus*, estas formaram um clado único nos cladogramas obtidos pelos métodos *neighbor-joining* e MP (FIGURA 28 e 30). Contudo, os valores de *bootstrap* são baixos e por isso não se pode confirmar o monofiletismo do gênero. Além disso, no cladograma obtido por UPGMA não foi observado a formação desse único clado, ficando agrupada apenas as espécies *M. claudicans* e *M. sulcatus*, as quais foram unidas também nos outros cladogramas com elevados valores de confiança (93% a 99%).

Um dos motivos para esta discrepância entre os dados aqui apresentados e a classificação tradicional baseada em caracteres morfológicos, pode ter se devido à utilização de seqüências parciais, ou seja,

seqüências incompletas na construção da filogenia do gênero *Microcosmus*, pois de acordo com NEI & KUMAR (2000) a utilização de genes curtos e segmentos de DNA não muito longos é sujeita a substituições no número de nucleotídeos que levam a grandes erros. Segundo ADAMKEWICZ et al. (1997) grupos proximamente relacionados têm sua filogenia melhor resolvida quando são utilizadas seqüências completas em detrimento das parciais. Contudo, devido a falta de seqüências completas pertencentes a este táxon depositadas no *GenBank*, não foi possível a construção de uma filogenia baseada exclusivamente em seqüências totais.

## **6- Conclusões**

- A extração de DNA realizada com reagente CTAB mostrou-se eficiente para a espécie *Microcosmus exasperatus*.

- Chordata se apresentou como um táxon monofilético, assim como Vertebrata, Tunicata e Cephalochordata.

- Apesar de estudos recentes que indicam maior proximidade entre Tunicata e Vertebrata, não foi possível a visualização deste cenário a partir dos cladogramas obtidos.

- O método UPGMA de construção de topologia parece não apresentar boa resolução no esclarecimento das relações filogenéticas de Chordata, Tunicata e Ascidiacea.

- Os grupos Ascidiacea e Thaliacea se mostraram parafiléticos.

- Não foi possível a confirmação da divisão do grupo Ascidiacea em duas ordens: Pleurogona e Enterogona. Contudo, os táxons Phlebobranchia, Stolidobranchia e Aplousobranchia foram confirmados para a maioria das árvores.

- Nos cladogramas obtidos, Appendicularia ficou caracterizado como o grupo mais basal na filogenia dos Tunicata.

- Aplousobranchia é um táxon monofilético na filogenia dos Tunicata.

- Foi possível constatar que Thaliacea tem forte relação de parentesco com Phlebobranchia, tendo possivelmente evoluído a partir de representantes deste táxon.

- Phlebobranchia e Stolidobranchia se mostraram monofiléticos. Assim como Molgulidae, uma das famílias pertencentes a este último táxon.

- Cionidae é um grupo representante de Phlebobranchia.

## **6- Referências Bibliográficas**

ADAMKEWICZ, S. L., HARASEWYCH, M. G., BLAKE, J., SAUDEK, D., BULT, C.J. 1997. **A molecular phylogeny of the Bivalve Mollusks**. Mol. Biol. Evol. vol. 14, n.6, p. 619-629 .

ADDIS, J.S, PETERSON, K.J. 2005. **Phylogenetic relationships of freshwater sponges (Porifera, Spongillina) inferred from analyses of 18S rDNA, COI mtDNA, and ITS2 rDNA sequences**. Zoologica Scripta. vol. 34, n. 6, p. 549 -557.

ABOUHEIF, E., ZARDOYA, R., MEYER, A.. 1998. **Limitations of metazoan 18S rRNA sequence data: implications for reconstructing a phylogeny of the animal kingdom and inferring the reality of the cambrian explosion**. J Mol. Evol. vol. 47, p. 394–405.

AGELL, G. , TURON, X. , DE CARALT, S., LOPEZ-LEGENTIL, S., URIZ, M.J. 2003. **Molecular and organism biomarkers of copper pollution the ascidian *Pseudodistoma crucigaster***. Marine Pollution Bulletin. vol. 48, p. 759-767.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J. RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2004. **Biologia Molecular da célula**. Porto Alegre:Aetmed. 1463p.

ALESHIN, V.V., MILYUTINA, I.A., KEDROVA, O.S., VLADYCHENSKAYA, N.S., PETROV, N.B. 1998. **Phylogeny of Nematoda and Cephalorhyncha derived from 18S rDNA**. J Mol Evol. vol. 47, p. 597–605.

AMORIM, D. S. 2002. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos. 153 p.

ANDERSON, D. H., SWINEHART, J. H. 1990. **The distribution of vanadium and sulfur the blood cells, and the nature of vanadium in the blood cells and plasma of ascidian, *Ascidia ceratodes***. Comp. Biochem. Physiol. vol. 99, n. 4, p. 585-592.

ANDERSON, D. H., BERG, J., SWINEHART, J. H. 1991. **Uptake of vanadium by the ascidian *Ascidia ceratodes***. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 99, n. 1/2, p. 151-158.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. 1990. **Basic local alignment search tool**. J. Mol. Biol. vol. 215, p. 403-410.

AVISE, J.C. 2004. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2 ed. Massachusetts:Sinauer. 684p.

BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, J. N., WOJCIECHOWSKI, M. F., CAMPBELL, C. S., DONOGHUE, M. J. 1995. **The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny**. Ann. Missouri Bot. Gard. vol. 92, p. 247-277.

BARGUES, M. D., MAS-COMA, S. 1997. **Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18s rDNA Sequences**. Mol. Biol. Evol. vol. 14, n. 2, p. 569-577.

BARNES, M. R., GRAY, I.C., 2003. **Bioinformatics for Geneticists**. New York: John Wiley & Sons Ltd. 422 p.

BATES, W. R. 2005. **Environmental factors affecting reproduction and development in ascidians and other protochordates**. Can. J. Zool. vol.83, p. 51-61.

BAX, N., WILLIAMSON, A., AGUERO, M., GONZALEZ, E., GEEVES, W. 2003. **Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity**. Marine Policy. vol. 27, p. 313-323.

BAXEVANIS, A.D. D.B., DAVISON, PAGE, R.D. M., PETSKO, G.A., STEIN, L.D., STORMO, G.D., LEONARD, S. 2002. **Current protocols in bioinformatics**. John Wiley & Sons.

BEDELL, J., KORF, I, YANDELL, M. 2003. **BLAST**. O'Reilly. 360p.

BELLAS, J., BEIRAS, R., VIAZQUEZ, E. 2003. **A standardisation of Ciona intestinalis (Chordata, Ascidiacea) embryo-larval bioassay for ecotoxicological studies**. Water Research. vol. 37, p. 4613–4622.

BENDEZU, I.F., SLATER, J.W. CARNEY, B.F. 2005. **Identification of Mytilus spp. and Pecten maximus in Irish Waters by Standard PCR of the 18S rDNA Gene and Multiplex PCR of the 16S rDNA Gene**. Marine Biotechnology. vol. 7, p. 687–696.

BLAIR, J. E., HEDGES, S.B. 2005. **Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals**. Mol. Biol. Evol. vol. 22, n. 11, p. 2275- 2284.

BLEIDORN, C., VOGT, L., BARTOLOMAEUS T. 2003. **New insights into polychaete phylogeny (Annelida) inferred from 18S rDNA sequences** Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. 29, n. 2, p. 279-288.

BONECEKER, A., C., T., BONECKER, S., L., C., BASSANI, C. Plâncton marinho. In: SILVA, J. S. V., SOUZA, R. C. C. L. **Água de lastro e bioinvasão**. Cap. 6. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, p. 103-123.

BROWN, S. M. **Bioinformatics: a biologist's guide to biocomputing and the internet**. Natick : Eaton Publishing, 2000. 188 p.

BRUSCA, R.C., BRUSCA, G.J. 2002. **Invetebrates**. 2 ed. Massachusetts:Sinauer.936p.

CALCAGNOTTO, D. 2001. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. Cap. 5, p. 51-63.

CAMERON, C.B. 2005. **Aphylogeny of the hemichordates based on morphological characters**. Can. J. Zool. vol. 83, p. 196-215.

CAMERON, C.B., SWALLA, B.J., GAREY, J.R. 2000. **Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analysis of deuterostome phyla**. Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 97, n. 9, p. 4469 - 4474.

CAMPOS, A., CUMMINGS, M.P., REYES, J.L., LACLETTE, J.P. 1998. **Phylogenetic relationships of Platyhelminthes based on 18S**. Molecular Phylogenetics and Evolution. vol.10, n.1, p. 1-10.

CANAPA, A., BARUCCA, M., MARINELLI, A., OLMO, E. 2001. **A molecular philogeny of Heterodonta (Bivalvia) base don small ribosomal subunit RNA sequences**. Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. 21, n. 1, p. 156-161.

CARLTON, J. T. 1996. **Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology**. Biological Conservation. vol. 78, p. 97-106.

CARLTON, J. T. 2003. **Community assembly and historical biogeography in the North Atlantic Ocean: the potential role of human-mediated dispersal vectors**. Hydrobiologia. vol. 503, p. 1-8.

CARRANZA, S., BAGUÑÀ, J., RIUTORT., M. 1999. **Origin and evolution of paralogous rRNA gene clusters within the flatworm family Dugesiidae (Platyhelminthes, Tricladida)**. Mol Evol. vol. 49, p. 250–259.

CASEY, D. 1992. **Primer on Molecular Genetics**. Washington: Oak Ridge National Laboratory. 43 p.

CASTRESANA, J., FELDMAIER-FUCHS, G., YOKOBORI, S., SATOH, N., PÄÄBO, S. 1998. **The mitochondrial genome of the hemichordate *Balanoglossus carnosus* and the evolution of deuterostome mitochondria**. Genetics. vol. 150, p. 1115–1123.

CLEMENT, M., POSADA, D., CRANDALL, K.A. 2000. **TCS: a computer program to estimate gene genealogies**. Molecular Ecology. Vol. 9, p. 1657-1659.

COHEN, C. S. **Botryllid ascidians: few invaders or many?** Disponível em : < <http://massbay.mit.edu/resources/pdf/MarinePDF/1999/MarineAbs3.pdf> >  
Acesso em: 9 nov. 2003.

COHEN, C.S., SAITO, Y., WEISSMAN, I.L. 1998. **Evolution of allorecognition in botryllid ascidians inferred from a molecular phylogeny.** *Evolution*. vol. 52, n. 3, p. 746-756.

COLEMAN, A.W., VACQUIER, V.D. 2002. **Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (*Haliotis*).** *J. Mol. Evol.* vol. 54, p. 246-257.

CONE, A. G., ZELLER, R. W. 2005. **Using ascidian embryos to study the evolution of developmental gene regulatory networks.** *Canadian Journal of Zoology*. vol. 83, n. 1, p. 75-89.

COPPING, A. E., NOSHO, T., HARBELL, S., LERNER, N. **Using public outreach and education as a means of prevention and control of nis introductions.** Disponível em: <[http://massbay.mit.edu/resources/pdf/MarinePDF/1999/Marine\\_Abs3.pdf](http://massbay.mit.edu/resources/pdf/MarinePDF/1999/Marine_Abs3.pdf)> Acesso em: 9 nov. 2003

COUTTS, A. D. M. **A biosecurity investigation of a barge in the Marlborough Sounds.** Disponível em: <<http://www.fish.govt.nz/sustainability/biosecurity/mhtag/underwater-vacuum-trial.pdf>> Acesso em: 9 nov. 2003.

CREIGHTON, T.E., 1999. **The encyclopedia of molecular biology.** New York: John Wiley & Sons, Inc. 2878 p.

DAVIES, N., RODERICK, G. K. 1999. **Determining pathways of marine bioinvasion: genetical and statistical approaches.** In First Conference on Marine Bioinvasions (ed. J. Pederson), pp. 251-255. Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology.

DEGNAN, B.M. 2001. Settlement and metamorphosis of the tropical ascidian *Herdmania curvata*. In: SAWADA, H., YOKOSAWA, H., LAMBERT, C.C. **The Biology of ascidians.** Tóquio: Springer-Verlag, p.258-263.

DELSUC, F., BRINKMANN, H., CHOURROUT, D., PHILIPPE, H. 2006. **Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates.** *Nature*. vol. 439, n. 23.

DESALLE, R. 2006. **What's in a character?.** *Journal of Biomedical Informatics*. vol. 39, p. 6-17.

DIAS, G.M. 2004. 88 f. **Estrutura de comunidade e variabilidade genética de ascídias coloniais do entremarés rochoso.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. & GREEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**. vol. 8, p. 175-185.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 220 p.

FERREIRA, C. E., GONÇALVES, J. E., COUTINHO, R. Cascos de navios e plataformas como vetores na introdução de espécies exóticas. In: SILVA, J. S. V., SOUZA, R. C. C. L. **Água de lastro e bioinvasão**. Cap. 1. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, p. 1-9.

FLOERL, O., INGLIS, G., MARSH, H. 2005. **Selectivity in vector management: an investigation of the effectiveness of measures used to prevent transport of non-indigenous species**. Biological Invasions. vol. 7, n. 3, p. 459-475.

FUTUYMA, D.J. 1993. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos. 631 p.

GAUR, D., LI, W. 1999. **Fundamentals of molecular evolution**. Massachusetts: Sinauer Associates. 481 p.

GIBAS, C., JAMBECK, P. 2001. **Developing Bioinformatics Computer Skills**. Cambridge: O'Reilly. 446 p.

GILLESPIE, J.J., YODER, M.J., WHARTON, R.A.. 2005. **Predicted Secondary Structure for 28S and 18S rRNA from Ichneumonoidea (Insecta: Hymenoptera: Apocrita): Impact on Sequence Alignment and Phylogeny Estimation**. J Mol Evol. vol. 61, p. 114–137.

GISSI, C., IANNELLI, F., PESOLE, G. 2004. **Complete mtDNA of *Ciona intestinalis* reveals extensive gene rearrangement and the presence of an *atp8* and an extra *trnM* gene in ascidians**. J. Mol. Evol. Vol. 58, p. 376-389.

GOPALAN, V., QIU, W., CHEN, M.Z., STOLTZFUS, A. 2006. **Nexplorer: phylogeny-based exploration of sequence family data**. Bioinformatics. vol. 22, n. 1, p.120–121.

GORAB, E. 2001. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e evolução**. Cap. 6. Ribeirão Preto: Holos. p. 64- 69.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; & GREEN, P. 1998. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. vol. 8, p. 195-202.

GROSBURG, R. K., LEVITAN, D. R., CAMERON, B. B. 1996. **Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD-PCR Markers: A Random Primer for the Novice and Nervous**. In: Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols. Wiley-Liss ed., New York.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98.

HAMPL, V., HORNER, D.S., DYAL, P., KULDA, J., FLEGR, J., FOSTER, P.G., EMBLEY, M.E. 2005. **Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: support for metamonada and excavata.** *Molecular Biology and Evolution.* vol. 22, n. 12, p. 2508-2518.

HELFENBEIN, K.G, BOORE, J.L. 2004 **The mitochondrial genome of *Phoronis architecta* - comparisons demonstrate that phoronids are Lophotrochozoan protostomes.** *Molecular Biology and Evolution.* vol. 21, n. 1, p. 153-157.

HUBER, J. L., SILVA, K. B., BATES, W. R., SWALLA, B. J. 2000. **The evolution of anural larvae in molgulid ascidians.** *Cell & Developmental Biology.* Vol., 11, p. 419-426.

HOLLAND, P.W.H. 2000. **Embryonic development of heads, skeletons and amphioxus: Edwin S. Goodrich revisited** *Int. J. Dev. Biol.* Vol. 44, p. 29-34.

JEFFERY, W.R., SWALLA, B.J., EWING, N., KUSAKABE, T. 1998. **Evolution of the ascidian anural larva: evidence from embryos and molecules.** *Mol. Biol. Evol.* vol.15, n. 12, p. 646-654.

JIMENEZ, P. C., FORTIER, S. C., LOTUFO, T. M. C., PESSOA, C., MORAES, M. E. A., MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V. 2003. **Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast.** *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* v. 287, p. 93- 101.

KANO, S., CHIBA, S., SATOH, N. 2001. **Genetic relatedness and variability in inbred and wild populations of the solitary ascidian *Ciona intestinalis* revealed by arbitrary primed polymerase chain reaction.** *Marine Biotechnology,* vol.3, p. 58-67.

KÖHSLER, M., LEITNER, B., BLASCHITZ, M., MICHEL. R., ASPÖCK, H., WALOCHNIK, J. 2006. **ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa).** *Parasitol Res.* vol. 98, p. 86-93.

KOTT, P. 1990. **The Australian Ascidiacea. Part2, Aplousobranchia (1).** *Memoirs of the Queensland Museum.* 29: 1-266.

KUSAKABE, T. 2001. Evolution of anural development in ascidians: roles of muscle-specific differentiation genes. In: SAWADA, H., YOKOSAWA, H., LAMBERT, C.C. **The Biology of ascidians.** Tóquio: Springer-Verlag, p. 225-229.

LAMBERT, C.C. 2005 a. **Historical introduction, overview, and reproductive biology of the protochordates.** *Can. J. Zool.* vol. 83, p. 1-7.

LAMBERT, C. C., LAMBERT, G. 1998. **Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas.** Marine Biology. v. 130, p. 675-688.

LAMBERT, G. 2005 b. **Ecology and natural history of the protochordates.** Can. J. Zool. vol. 83, p. 34-50.

LAMBERT, G. 2002 **Nonindigenous Ascidians in Tropical Waters.** vol. 56, no. 3, p. 291–298.

LESK , A.M. 2002. **Introduction to bioinformatics.** New York: Oxford University Press. 255p.

LI, H.M., DENG, R.Q., WANG, J.W., CHEN, Z.Y., JIA, F.L., WANG, X.Z. 2005. **A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera : Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences.** Molecular Phylogenetics And Evolution. vol. 37, n. 2, p. 313-326.

LIMA, J.P.M.S. **Estudos taxonômicos moleculares no táxon Phaseoleae DC. (Leguminosae, Papilionoideae) utilizando seqüências de DNA ribossômico (rDNA).** 2003. 136 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LOTUFO, T. M. C. **Ascidiacea (Chordata:Tunicata) do litoral brasileiro.** 2002. 183 f. Tese de doutorado, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

MARGULIS, L., SCHWARTZ, K.V. 2001. **Cinco reinos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 497p.

MCARTHUR, A.G., KOOP, B.F. 1999. **Partial 28S rDNA sequences and the antiquity of hydrothermal endemic gastropods.** Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. 13, n. 2, p. 255–274.

MCMILLEN-JACKSON, A.L., BERT, T.M.. 2004. **Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States.** Marine Biology. Vol. 145, p. 769–777.

MEIDANIS, J., SETÚBAL, J. C., 1994. **Uma introdução à biologia computacional.** Catalogação impressa na publicação elaborada peça biblioteca de informática da UFPE. Recife. 131p.

MENDOLA, D. **Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics.** Biomol. Engineering. v. 20, p. 441-458. 2003.

MEYER, D. Análise filogenética de seqüências de DNA. In: AMORIM, D.S. **Elementos básicos de sistemática filogenética.** 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 1997. cap. 14, p.187-208.

- MICHIBATA, H., UYAMA, T., UEKI, T., KANAMORI, K. 2001. **The mechanism of accumulation and reduction of vanadium by ascidians**. In: SAWADA, H., YOKOSAWA, H., LAMBERT, C.C. **The Biology of ascidians**. Tóquio: Springer-Verlag, p.363-373.
- MICHIBATA, H., YAMAGUCHI, N., UYAMA, T., UEKI, T. 2003. **Molecular biological approaches to the accumulation and reduction of vanadium by ascidians**. Coordination Chemistry Reviews. vol. 237, p. 41-51.
- MILLAR, R. H. 1971. **The biology of ascidians**. Adv. Mar Biol. vol. 9, p. 1-100.
- MYIAKI, C.Y., RUSSO, C.A.M., PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. Cap. 9, p. 97-107.
- MONNIOT, C., MONNIOT, F. 1987. **Les ascidies de Polynésie française**. Paris: Éditions du Muséum Paris. 154f.
- MONNIOT, C., MONNIOT, F., LABOUE, P. 1991. **Coral reef ascidians of New Caledonia**. Pris: Orstom. P. 11-239.
- MOORE, J. 2003. **Uma introdução aos invertebrados**. São Paulo:Santos Editora. 356p.
- MORENO, T.R. 2003. **Filogenia da ordem Aplousobranchia (Tunicata, Ascidiacea)**. 161 f. Tese de doutorado, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MOUNT, D.W. 2004. **Bioinformatics: sequence and genome analysis**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 692p.
- NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. Cap. 8, p. 82-96.
- NARANJO, S.A., KUKURTÇU, H.B., BARBERO, C., MARTIN, S., CARBALLO, J.L. 2001. In: SAWADA, H., YOKOSAWA, H., LAMBERT, C.C. **The Biology of ascidians**. Tóquio: Springer-Verlag, p. 355- 360.
- NEI, M., KUMAR, S. 2000. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press. 333p.
- NIELSEN, C. 1998. **Origin and evolution of animal life cycles**. Biol. Rev. vol. 73, p. 125-155.
- NISHIKAWA, T, BISHOP, J.D.D., SOMMERFELDT, A.D. 2000. **Occurrence of the alien ascidian *Perophora japonica* at Plymouth**. Journal of the marine biological association of the United Kingdom. vol. 80, n. 5, p. 955-956.

NISHINO, A., SATOH, N. 2001. **The simple tail of chordates: phylogenetic significance of appendicularians.** Genesis. Vol. 29, n. 1, p. 36-45.

NOAA. **Korea-us aquaculture** Disponível em: <[www.lib.noaa.gov/korea/main\\_species/sea\\_squirt.htm](http://www.lib.noaa.gov/korea/main_species/sea_squirt.htm)> Acesso em: 9 nov. 2003.

ODINTSOVA N. A., BELOGORTSEVA, N. I., ERMAK, A. V., MOLCHANOVA, V. I., LUK'YANOV, P. A. 1999. **Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian *Didemnum ternetanum* on cultivated marine invertebrate cells.** Biochimica et Biophysica Acta. v. 1448, p. 381-389.

OLIVERIO, M., CERVELLI, M., MARIOTINNI, P. 2002. **ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoida).** Molecular Biology and Evolution. vol. 25, p. 63-69.

PAGE, R.D.M., HOLMES, E.C.1998. **Molecular evolution:a phylogenetic approach.** Blackwell Science Ltda. 343 p.

PERTSEMLIDIS, A., FONDON III, J. W. **Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy).** Genome Biology. v. 2, n. 10, p. 1-10. 2001.

POMPONI S. A. 2003. **The potential for the marine biotechnology industry.** Disponível em: <<http://massbay.mit.edu/resources/pdf/MarinePDF/1999/MarineAbs3.pdf>> Acesso em: 9 nov. 2003

PROSDOCIMI, F., CERQUEIRA, G.C., BINNECK, E., SILVA, A. F., REIS, A.N., JUNQUEIRA, A. C. M., SANTOS, A. C. F., JUNIOR, A.N., WUST, C. I., FILHO, F. C., KESSEDJAN, J. L., PETRETSKI, J. H., CAMARGO, L. P., FERREIRA, R. G. M., LIMA, R. P., PEREIRA, R. M., JARDIM, S., SAMPAIO, V. S., FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V. 2002. **Bioinformática: manual do usuário.** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. vol. 29, p. 12-25.

PURVES, W.K., SADAVA, D., ORIAN, G.H., HELLER, H.C. 2002. **Vida a ciência da biologia.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 1126p.

RAAHAUGE, P., KRISTENSEN, T.K. 2000. **A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae; Gastropoda) by use of the internal transcribed spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters.** Acta Tropica. vol. 75, p. 85-94

ROCHA, L.A., BASS, A.L., ROBERTSON, D.R., BOWEN, B.W. 2002. **Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei:Acanthuridae).** Molecular Ecology. Vol. 11, p. 243-252.

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

RUPPERT, E. E., BARNES, R. D. 1996. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca. 1029p.

RUPPERT, E.E., FOX, R.S., BARNES, R.D. 2004. **Invertebrate Zoology**. 7. ed. BELMONT: Brooks/Cole-Thompson Learning. 953p.

RUSSO, C. A. M. 2001. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. Cap. 12, p. 130-136.

RUSSO, C.A.M., TAKESAKI, N., NEI, M. 1995. **Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species**. Mol. Biol. Evol. vol. 12, n. 3, p. 391-404.

SCHNEIDER, H. 2003. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos editora. 114p.

SILVA, E. P. 2004. Marcadores moleculares no rastreamento da bioinvasão. In: SILVA, J. S. V., SOUZA, R. C. C. L. **Água de lastro e bioinvasão**. Cap. 14. Rio de Janeiro: Interciência, p. 103-123.

SILVA, E.P. , RUSSO, C.A.M. 2000. **Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics**. Hydrobiologia. Vol. 420, p. 119-135.

STACH, T., TUBERVILLE, J. M. 2004. **Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters**. Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. P. 408-428.

SALDUCCI, M.D, MARTY, C., FOUQUET, A., GILLES, A., 2005. **Phylogenetic relationships and biodiversity in hylids (Anura : Hylidae) from French Guiana**. Comptes Rendus Biologies. Vol. 328, p. 1009-1024.

SHI, M., CHEN, X.X., VAN ACHTERBERG, C. 2005. **Phylogenetic relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rDNA, 28S rDNA D2,18S rDNA gene sequences and morphological characters**. Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. 37, p. 104–116.

STACH, T., TURBEVILLE, J. M. **Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters**. Mol. Phyl. Evol. v. 25, p. 408–428. 2002.

SUMIDA, M., KATO, Y., KURABAYASHI, A. 2004. **Sequencing and analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) and coding regions in the *EcoR I* fragment of the ribosomal DNA of the Japanese pond frog *Rana nigroomaculata***. Genes Genet. Sust. vol. 79, p. 105-118.

SWALLA, B. J., CAMERON, C.B., CORLEY, L.S., GAREY, J.R. 2000. **Urochordates are monophyletic within the deuterostomes**. Syst. Biol. vol. 49, n. 1, p. 52-64.

SWALLA, B. J. 2001. phylogeny of the Urochordates: implications for Chordate evolution. In: SAWADA, H., YOKOSAWA, H., LAMBERT, C.C. **The Biology of ascidians**. Tóquio: Springer-Verlag, p. 219-224.

TARJUELO, I., POSADA, D., CRANDALL, K.A., PASCUAL, M., TURON, X. 2001. **Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean**. Marine Biology. vol. 139, p. 455-462.

TEIXEIRA, V., L., 2004. Produtos naturais marinhos. In: SILVA, J. S. V., SOUZA, R. C. C. L. **Água de lastro e bioinvasão**. Cap. 12. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, p. 249-279.

TUBERVILLE, J. M., SCHULZ, J., RAFF, R. A., 1994. **Deuterostome phylogeny and sister group of the chordates: evidence from molecules and morphology**. Mol. Biol. Evol. vol. 11, n. 4, p. 648-655.

TURON, X., LÓPEZ-LEGENTIL, S. 2004. **Ascidian molecular phylogeny inferred from mtDNA data with emphasis on the Aplousobranchiata**. Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. 33, p. 309-320.

TURON, X., TARJUELO, I., DURAN, S., PASCUAL, M. 2003. **Characterising invasion processes with genetic data: an Atlantic clade of *Clavelina lepadiformis* (Ascidiacea) introduced into Mediterranean harbours**. Hydrobiologia. vol. 0, p. 1-7.

VAN NAME, W. G. 1945. **The north and south American ascidians**. Bulletin of the American Museum of Natural History. Volume 84.

VERMEIJ, G. J. 1996. **An agenda for invasion biology**. Biological Conservation. Vol. 78, p. 3-9.

WADA, H. 1998. **Evolutionary history of free-swimming and sessile lifestyles in Urochordates as deduced from 18S rDNA molecular phylogeny**. Mol. Biol. Evol. vol. 15, n. 9, p. 1189-1194.

WADA, H., KAZUHIRO, W. M., NAKAUCHI, M., SATOH, N. 1992. **Phylogenetic relationships between solitary and colonial ascidians, as inferred from sequence of the central region of their respective 18S rDNAs**. Biol. Bulletin. Vol. 183, p. 448-455.

WANG, T., ZHANG, N., DU, L. 2005. **Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves**. Biotechnology Letters. Vol. 27, p. 629-633.

WASSON, K., ZABIN, C. J., BEDINGER, L., DIAZ, M. C., PEARSE, J. S. 2001. **Biological invasions of estuaries without international shipping: the importance of intraregional transport**. vol. 102, p. 143-153.

- WIKLUND, H., NYGREN, A., PLEIJEL, F., SUNDBERG, P. 2005. **Phylogeny of Aphroditiformia (Polychaeta) based on molecular and morphological data.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol. 37, p. 494–502.
- WILEY, E. O., SIEGEL-CAUSEY, D., BROOKS, D. R., FUNK, V. A. 1991. **A Primer of Phylogenetic Procedures The Compleat Cladist.** Disponível em: < [http://www.amnh.org/learn/pd/fish\\_2/pdf/compleat\\_cladist.pdf](http://www.amnh.org/learn/pd/fish_2/pdf/compleat_cladist.pdf) > Acesso em: 11 jan. 2006.
- WINCHELL, C. J., SULLIVAN, J., CAMERON, C.B., SWALLA, B.J., MALLATT, J. 2002. **Evaluating hypotheses of deuterostome phylogeny and Chordate evolution with new LSU and SSU ribosomal DNA data.** *Mol. Biol. Evol.* vol.19, n. 5, p. 762–776.
- WINNEPENNINCKX, B., STEINER, G., BACKELJAU, T., DEWACHTER, R. 1998. **Details of gastropod phylogeny inferred from 18S rRNA sequences.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol. 9, n. 1, p. 55–63.
- WEIR, B.S. 1996. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data.** 2. ed. Massachusetts:Sinauer Associates, 430p.
- WOLLSCHIED, E., WÄGELE, H. 1999. **Initial results on the molecular phylogeny of the Nudibranchia (Gastropoda, Opisthobranchia) based on 18S rDNA data.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol. 13, n. 2, p. 215–226.
- YOBORI, S., WATANABE, Y., OSHIMA, T. 2003. **Mitochondrial genome of *Ciona savignyi* (Urochordata, Ascidiacea, Enterogona): comparison of gene arrangement and genes wiith *Halocynthia roretzi* mitochondrial genome.** *J Mol Evol.* vol. 57, p. 574-587.
- YOKOTA, Y., KAWATA, T., IIDA, Y., KATO, A., TANIFUJI, S. 1989. **Nucleotide sequences of the 5,8S rRNA and transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA.** *Journal of Molecular Evolution*. vol. 29, p. 294-301.
- YOUNG, C.M., SEWELL, M.A., TYLER, P.A., METAXAS, A. 1997. **Biogeographic and bathymetric ranges of Atlantic deep-sea echinoderms and ascidians: the role of larval dispersal.** *Biodiversity and Conservation* vol. 6, p. 1507-1522.
- ZENG, L., SWALLA, B. J. 2005. **Molecular phylogeny of the protochordates: chordate evolution.** *Can. J. Zool.* vol. 83, p. 24-33.
- ZRZAVY, J., MIHULKA, S., KEPKA, P., BEZDEK, A., TIETZ, D. 1998. **Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence.** *Cladistics*. vol. 14, p. 249-285.

## ANEXO 1

### Aspectos gerais de Ascidiacea

Apesar de sua abundância em regiões costeiras, as ascídias são pouco conhecidas (RODRIGUES et al., 1998). Tais animais são invertebrados marinhos que apresentam uma grande variedade de mecanismos reprodutivos e estilos de vida (BATES, 2005), apresentando tanto o hábito solitário como colonial (RODRIGUES et al., 1998). As espécies solitárias são maiores, também denominadas ascídias simples; já as ascídias coloniais são compostas por zoóides, muitas vezes de tamanho diminuto (RUPPERT & BARNES, 1996). No entanto, as colônias podem atingir tamanhos consideráveis, excedendo muitas vezes um metro (RUPPERT et al., 2004).

Estes organismos apresentam diferentes formas e tamanhos, de acordo com seu hábitat e modo de vida, estando amplamente distribuídos desde regiões rasas até grandes profundidades, onde há poucos indivíduos de muitas espécies (MILLAR, 1971). Grande número de animais é encontrado aderido à rochas, algas, conchas e cascos de navios ou podem viver ainda em substratos não consolidados como lama ou areia (DIAS, 2004).

Como dito anteriormente, as ascídias são em sua maioria hermafroditas de fertilização cruzada (RUPPERT et al., 2004), podendo a reprodução ocorrer de duas formas: sexuada e assexuadamente (RUPPERT & BARNES, 1996).

A reprodução assexuada é característica somente das ascídias coloniais, que ocorre por meio de brotamento (RUPPERT & BARNES, 1996). Contudo, a forma sexuada ocorre tanto em animais de hábito solitário, como colonial (RUPPERT et al., 2004).

Ascídias solitárias são ovíparas (RUPPERT et al., 2004), sendo seu modo de reprodução variável de acordo com a família e a espécie a qual

pertencem (MONNIOT et al., 1991). Tais organismos liberam seus gametas diretamente na água, local onde também ocorre a fertilização (RUPPERT et al., op. cit.). Já os animais coloniais, em contraste com as formas solitárias, são todos vivíparos; apenas os gametas masculinos são lançados na água e a fecundação ocorre no oviduto materno (MONNIOT et al., 1991). Apesar de existirem variações quanto ao modo de reprodução sexuada quando comparamos ascídias solitárias com coloniais, o resultado final da fusão dos gametas em ambos os casos é a formação de uma larva planctônica de curta duração, com desenvolvimento ocorrendo em torno de minutos ou horas (LAMBERT, 2002). Segundo MOORE (2003), as larvas planctônicas são uma vantagem para animais com pouca motilidade ou sésseis, assim como as ascídias, pois como larvas estes organismos podem explorar novas áreas dispersando assim a espécie.

De acordo com DEGNAN (2001), muitas larvas de invertebrados marinhos se assentam e metamorfoseiam em resposta a sinais químicos específicos do meio ambiente. As ascídias não fogem a esta regra, pois suas larvas tanto podem ser atraídas, como repelidas por componentes químicos produzidos por ascídias próximas, bem como, por substâncias inorgânicas presentes na água. (MONNIOT et al., 1991). Esses mesmos autores indicam ainda, que devido a escassez de trabalhos relativos a esse tema, pouco é conhecido a respeito dos fatores que promovem a atração ou repulsão das larvas.

Quanto ao aspecto externo, as ascídias apresentam uma extremidade aderida ao substrato, enquanto a outra se apresenta livre e portando duas aberturas, denominadas sifões. Seus corpos apresentam-se recobertos por uma túnica, que envolve completamente o indivíduo, a qual contém polímeros muito semelhantes à celulose, denominado tucicina. Tais túnicas são geralmente espessas, mas variam de uma consistência gelatinosa até fibrosa (RUPPERT & BARNES, 1996; RODRIGUES et al., 1998).

Quanto à alimentação, as ascídias são eficientes organismos filtradores, que podem processar grandes quantidades de água (AGEEL et al., 2003). A água contendo o plâncton em suspensão entra pelo sifão inalante indo em direção à faringe onde as partículas orgânicas são retidas (RUPPERT & BARNES, 1996) e coletadas por um muco secretado pelo endóstilo. A água

filtrada se move através das fendas presentes na faringe para dentro do átrio e então seguem para fora do corpo do animal por meio do sifão exalante (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001).

Um outro fato relacionado ao hábito filtrador destes animais é a sua capacidade de concentrar em seus tecidos elementos tóxicos encontrados no mar, tanto hidrocarbonetos, como metais pesados (arsênico, cádmio, cromo, cobalto, ferro, cobre, mercúrio, selênio, zinco entre outros) (TARJUELO et al., 2001), por essa razão estes organismos são considerados bons indicadores da qualidade da água, sendo utilizados em bioensaios de poluição marinha (AGELL et al., 2003; BELLAS et al. 2003; LAMBERT, 2005b).

Apesar da maioria das ascídias possuírem capacidade filtradora, há alguns organismos residentes em regiões abissais, que perderam tal habilidade, tendo se modificado para um estilo de vida carnívoro, alimentando-se de pequenos crustáceos e poliquetas (LAMBERT, 2005b). Esta mesma autora indica ainda, que estes organismos de águas profundas apresentam grande redução de tamanho quando comparadas aos seus parentes de águas rasas. Além disso, espécies abissais são surpreendentemente abundantes e apresentam grande distribuição, ocorrendo em todos os oceanos.

Além de todas estas características mencionadas acima, um dos fatos mais incomuns a cerca da biologia das ascídias é a capacidade de seu coração inverter o sentido do batimento cardíaco e de concentrar grande quantidade de metais pesados em seu sangue (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001). Segundo MICHIBATA et al. (2001), Martin Henze, químico alemão, observou que as células sangüíneas destes organismos apresentavam altos níveis de um metal pesado, o vanádio. Tal descoberta despertou o interesse pela pesquisa do possível papel deste metal como pigmento respiratório, ou seja, no transporte de oxigênio. De acordo com MICHIBATA et al. (2003), muito do interesse a cerca da descoberta feita pelo pesquisador alemão se deveu a posição filogenética das ascídias, visto que, estes animais estão agrupados dentro do filo Cordata, sendo um grupo próximo de Vertebrata. Apesar do interesse a cerca da função do vanádio nas células sanguíneas destes animais, ainda não está completamente elucidada os modelos nos quais as ascídias retiram este elemento da água do mar (ANDERSON et al., 1991), nem a razão

pela qual ocorre este acúmulo, mas acredita-se que isso as tornem não palatáveis para potenciais predadores, como os peixes (LAMBERT, 2005b).

## Aspectos ecológicos

As ascídias apresentam grande importância na cadeia trófica marinha, pois uma grande variedade de predadores se alimenta de tais animais, como exemplo tem-se os poliquetas, moluscos e crustáceos (LAMBERT, 2005b). Além disso, MONNIOT et al. (1991) indicam ainda, que não são apenas os organismos invertebrados que se alimentam destes animais, visto que a partir de análises do conteúdo estomacal, já foram encontradas ascídias em diversos vertebrados, tais como peixes e mamíferos aquáticos (cetáceos e focas).

Em contraste com muitos grupos de animais marinhos, as ascídias não possuem grande interesse econômico. Entretanto, como organismos incrustantes (*fouling*) este grupo é importante e contribui largamente para o problema de incrustação em cascos de embarcações e estruturas à deriva (MILLAR, 1971). Segundo MONNIOT et al (1991), organismos marinhos incrustantes, podem incluir tanto algas, animais fixos, como também, todas as criaturas sem ou com pouca motilidade que vivem associadas a outras criaturas, seja no meio destas ou como epibiontes, que rapidamente cobrem substratos feitos pelo homem.

Nos primeiros estágios de desenvolvimento das comunidades incrustantes, as ascídias não estão presentes. Contudo, posteriormente, este grupo torna-se abundante, contribuindo como grupo dominante nos últimos estágios (MILLAR, 1971). Segundo este mesmo autor, o que faz do *fouling* um problema, não é o peso dos animais, mas a fricção adicional que os organismos causam durante o deslocamento das embarcações, acarretando perda de velocidade do barco e dificuldade nas manobras (FLOERL et al., 2005).

## Ascídias como fonte alimentar e de novos fármacos

O homem em muitas partes do mundo utiliza as ascídias como fonte alimentar, sendo suficientemente importantes para entrar nas estatísticas de pesca da F.A.O. (*Food and Agriculture Organization*) (MILLAR, 1971; MONNIOT et al., 1991). De acordo com estes mesmos autores, as principais espécies utilizadas como alimento são grandes e coletadas em grandes quantidades, podendo ser vendidas frescas ou enlatadas. Como exemplo destas espécies tem-se: *Microcosmus sp.*, *Styela plicata* e *Polycarpa pomaria* consumidos em países do Mediterrâneo; *Pyura chilensis* na América do Sul e *Halocynthia roretzi* no Japão. Segundo MILLAR op. cit., há alguns trabalhos que além de mencionar as ascídias como fonte nutricional na dieta de diversas comunidades, relatam também seu uso como iscas utilizadas na pesca.

Além de possuir função nutricional para populações ao redor do globo, as ascídias vêm ganhando importância como fonte de compostos com atividade biológica e potencialmente medicinal (ODINTSOVA et al., 1999, MENDOLA, 2003). Segundo POMPONI (2003), organismos marinhos apresentam-se como uma fonte de componentes químicos únicos para o desenvolvimento de produtos em diversas indústrias, tais como: farmacêutica, cosmética, agroquímica, suplementos nutricionais, química fina, entre outras; gerando assim grandes somas de dinheiro.

Particularmente os invertebrados marinhos tem sido o principal foco de interesse da indústria química de produtos naturais, isso ocorrendo, devido à presença de grande número de estruturas complexas e inéditas isoladas destes organismos (TEIXEIRA, 2004). Desse modo, tanto ascídias quanto esponjas, que não são tradicionalmente explorados como recursos pesqueiros, vem ganhando espaço pelo seu potencial na produção de componentes farmacêuticos (NARANJO et al., 2001).

Estudos realizados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (The United States National Cancer Institute) têm mostrado que invertebrados marinhos apresentam maior incidência de componentes com atividade antitumoral e citotóxica do que outros grupos zoológicos e que os tunicados figuram como um dos mais promissores grupos como fonte de novos

princípios ativos para o desenvolvimento de fármacos (JIMENEZ et al., 2003). De acordo com TEIXEIRA (2004), os princípios ativos isolados de tunicados possuem importância na atividade antitumoral, antiviral e imunossupressora, havendo casos de moléculas que são ativas contra *Herpes simplex* (vírus I e II).

Contudo, esses componentes são em sua maior parte metabólitos secundários, que são produzidos em pequenas quantidades ( $10^{-4}$  -  $10^{-6}\%$ ) em relação ao peso úmido do animal (MENDOLA, 2003). Em vista disto, surgiu a necessidade da produção destes animais em larga escala, culminando assim no aparecimento de fazendas de cultivo de ascídias, que estão distribuídas, principalmente no Japão e na Coreia (NOAA, 2003).

Em 1982, a produtividade destas fazendas chegava apenas à soma de 39 toneladas/m<sup>2</sup>. No entanto, com o passar dos anos este valor aumentou para 9.000 toneladas/m<sup>2</sup> em 1985 e 42.800 toneladas/m<sup>2</sup> em 1994. Apesar da elevada taxa de produção e do emprego de uma avançada tecnologia na aquicultura de tunicados, ainda se tem alto índice de mortalidade destes animais durante seu período de crescimento. (NOAA, 2003).

## Bioinvasão

Outro aspecto que relaciona as ascídias à aquicultura consiste no fato destes organismos causarem danos à produção de espécies de interesse para cultivo em larga escala, tais como peixes e moluscos (COUTTS, 2002). Além disso, ascídias não nativas podem ser transportadas em conchas e peixes marinhos utilizados na maricultura (LAMBERT, 2001) sendo portanto uma fonte para a introdução de espécies exóticas (FERREIRA et al., 2004), que segundo VERMEIJ (1996), são organismos ou qualquer material biológico capaz de se propagar, incluindo sementes, ovos, esporos..., os quais entram em um ecossistema sem que antes houvesse seu registro anterior, ou seja, é a expansão geográfica de uma espécie em uma dada área, antes não ocupada.

Há vários tipos de vetores para a introdução de tais organismos invasores: via água de lastro, aquariorfilia, bioincrustação, aquicultura entre

outros; os quais quase sempre estão relacionados à atividades de interesse sócio-econômicos (LAMBERT, 2002; FERREIRA et al., 2004).

Assim sendo, diversas espécies marinhas estão sendo transportadas dentro e entre os diferentes oceanos sem “respeitar” barreiras temporais e espaciais (CARLTON, 1996), propiciando sua expansão para regiões em que provavelmente jamais habitariam por seu próprio processo natural de expansão (CARLTON, 2003). Tal fato se reflete na homogeneização da fauna e flora mundial devido a eliminação ou redução das barreiras naturais que separam e mantêm a integridade dos diferentes ecossistemas (LEWIS et al., 2003; SILVA et al., 2004).

Como um possível indicador desses fenômenos de bioinvasão tem-se as ascídias, pois estes animais possuem larva livre-natante de curta duração, sendo desta forma, incapazes por si só, de realizarem grandes deslocamentos, sendo necessário seu transporte por meio da ação antropogênica (LAMBERT & LAMBERT, 1998; RODRIGUES *et al.*, 1998; LAMBERT, 2002).

De acordo com LAMBERT (2001) todos as ordens de Ascidiacea apresentam representantes aliens e isto pode ser verificado através dos diversos trabalhos que reportam a presença de ascídias nas mais diversas regiões do globo. Como exemplo de tais invasões, é possível citar as presenças de *Styela clava*, uma espécie asiática que chegou à América do Norte via Europa (CARLTON, 1996), *Perophora japonica*, uma ascídia alien oriunda da Ásia, que chegou à Plymouth (Inglaterra) no ano de 1999 associada à alga exótica *Sargassum muticum* (NISHIKAWA et al., 2000).

DIAS (2004) e MILLAR (1971), indicam também a presença de invasões na Inglaterra e até mesmo no Brasil, fato observado no Canal de São Sebastião em São Paulo. Além destes trabalhos, TURON et al. (2003), indicam que diversas espécies de ascídias não nativas tem sido reportadas em portos e marinas da região do Mar Mediterrâneo e na costa da Califórnia (LAMBERT & LAMBERT, 1998).

As introduções de ascídias exóticas em regiões portuárias vêm se tornando um evento comum com o passar dos anos (LAMBERT, 2002), havendo até mesmo uma homogeneização da fauna portuária (WASSON et al., 2001). Como as ascídias podem viajar de porto a porto, o resultado é uma história de contínuas re-infestações destas espécies dentro de populações já

existentes nos portos ou até mesmo, repetidas invasões dentro de novos locais de soltura (MONNIOT et al., 1991). Logo, espécies que se apresentam largamente distribuídas ao redor do mundo, sendo muitas vezes consideradas cosmopolitas, puderam ter na verdade seus padrões de distribuição modificados por meio do transporte de espécies pelo globo (FERREIRA et al., 2004). Devido a isso, espécies de ascídias transportadas principalmente como incrustantes são candidatas a re-examinação de sua biogeografia histórica (CARLTON, 2003).

Esta introdução de tunicados exóticos em ecossistemas naturais tem sido objeto de preocupação de diferentes pesquisadores em diversas partes do mundo, pois a ocorrência destes animais pode causar sérios impactos econômicos, sociais e ambientais, como a competição com espécies nativas, por áreas de fixação e alimentação (LAMBERT, 2002; BAX *et al.*, 2003; COHEN, 2003, COPPING *et al.*, 2003).

Por tudo isso, percebe-se que o problema das invasões biológicas é extremamente sério, tendo sido identificado como uma das cinco principais ameaças à biodiversidade marinha global e citada como a causa primária da quebra do domínio natural da fauna global (HOLLAND, 2000).

No caso do transporte de espécies por meio do tráfego marítimo, os portos e as marinas são os principais locais de soltura dos organismos invasores (TURON et al., 2003). Para as ascídias, tais tipos de ambiente são habitats ideais, pois existe uma grande variedade de estruturas submersas para assentamento das larvas e há grande turbidez da água, que promove locais abrigados da luz solar (MONNIOT et al., 1991).

Além disso, as águas são nutricionalmente ricas, havendo grande proliferação de bactérias, que constituem uma fonte de alimentação para organismos filtradores, tais como as ascídias. Outro fato positivo para a presença de animais com esse tipo de hábito, se dá, pelo constante movimento de navios, o que promove a circulação da água e sua conseqüente mistura tanto horizontalmente, quanto verticalmente, o que favorece a suspensão de partículas e oxigenação de habitats eutróficos (MONNIOT *op. cit.*; TARJUELO et al., 2001).

Uma outra característica que propicia a presença de ascídias em regiões portuárias é a capacidade de tolerar flutuações de salinidade, poluição e

temperatura, aclimatando-se rapidamente a essas mudanças (LAMBERT, 2002). Além disso, muitas espécies alcançam a maturidade sexual em poucas semanas e possuem longo período reprodutivo, podendo aumentar o tamanho da população em pouco tempo (DAVIES & RODERICK, 2003).

## ANEXO 2

Seqüência parcial da região 18S do DNA ribossômico nuclear de *Microcosmus exasperatus*.

```
TGCGGTTGAAACTCGTAGTTGGATCTTGGGTGGGCGCCGCCGGTCCGTC
GCAAGGCGTGTTACTGGCGGCGCTCGCCTCGCCTTCGGTTCTCTGTCGGT
GCTCTTGACTGAGTGTTCGGCGGTGGCCGATAAGTTTACTTTGAAAAAATTA
GAGTGTTCAAAGCAGGCACTTCGCCTGAATAGTGTTGCATGGAATAATGGA
ATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAGCGCGAGGTAATGATTA
AGAGGGACAGACGGGGGCGTCCGTA CTGCGT TAGAGGTGAAATTCTT
GGATCGGCGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGAATGTTTTTC
TTTAATCAAGAGCGAAAGTCAGAGGTTTGAAGACGATCAGATACCGTCCTA
GTTCTGACTATAAACGATGCCAACTAGCGATCGGGAGGCGTTACCATGAC
GACCTTCCCGGCAGCTTCCGGGAAACCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAA
GTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCCGG
CCCGGACACAGGTAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGG
GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGATCGATTTGTCTGGTTAATT
CCGATAACGAACGAGACTCTGGCATGCTAAATAGTTACGCGACCTTCTCG
GTCGGCGTTTAACTTCTTAGAGGGACTAGTGGCGTTTAGCCACACGAGATT
GAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTTCGGGGCCGCACGCGCG
CTACACTGAATGGATCAGCGAGTGTTTCGTCCTAGTCCGAAAGGACCGGGT
AACCCGTTGAACCTCATTTCGTGATTGGGATAGGGACTTGCAATTGTTTCCC
TTGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCAAGTCATCAACTTGCGTTGATTACG
TCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTA
GTGAGATCCTTGGATCGGCCCGTCGCTGCTGGCAACGGCAGCGTCGGC
GTGCTGAGAAGACGATCAA ACTTGATCATT TAAAGGAAGGTAAAGTCGTAA
TACGCTGGC
```