

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIO KIYONORI NAKAMURA

**IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE *Ulva* (ULVACEAE, ULVALES) NA PORÇÃO
NORTE-NOROESTE DA BAÍA DE OSAKA, JAPÃO, E ELABORAÇÃO DE UMA
NOVA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR USANDO PCR-RFLP**

PONTAL DO PARANÁ

2008

CASSIO KIYONORI NAKAMURA

IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE *Ulva* (ULVACEAE, ULVALES) NA PORÇÃO NORTE-NOROESTE DA BAÍA DE OSAKA, JAPÃO, E ELABORAÇÃO DE UMA NOVA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR USANDO PCR-RFLP

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado I como requisito parcial à conclusão do Curso de Graduação em Oceanografia, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kawai

Co-orientador: Prof. Dr. Hanyuda Takeaki

PONTAL DO PARANÁ

2008

TERMO DE APROVAÇÃO

CASSIO KIYONORI NAKAMURA

IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE *Ulva* (ULVACEAE, ULVALES) NA PORÇÃO NORTE-NOROESTE DA BAÍA DE OSAKA, JAPÃO, E ELABORAÇÃO DE UMA NOVA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR USANDO PCR-RFLP

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado I como requisito parcial à conclusão do Curso de Graduação em Oceanografia, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora

Orientador Prof. Dr. Hiroshi Kawai

Departamento de Ciências, Universidade de Kobe

Prof^a. Dr^a. Franciane Pellizzari

Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Paraná

Prof^a. Dr^a. Mariana Cabral de Oliveira

Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo

Pontal do Paraná, 26 de junho de 2006

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Hitoshi, por sempre me incentivar, por me apoiar incondicionalmente no meu intercâmbio para o Japão e pelo apoio financeiro durante toda a graduação. À minha mãe Kumiko pelo apoio financeiro e emocional durante a graduação, meu irmão Kentaro, pelas dicas e longas conversas sobre relações Nipo-brasileiras e à minha irmã Mayumi, pelas impressões da monografia, pelas dicas e conversas sobre o futuro do monitoramento ambiental. À minha avó Mistuko, pelo apoio emocional, financeiro e pela estadia no Japão durante o intercâmbio. À minha outra avó Seiko, pelas histórias sobre o Japão

Ao Professor Doutor Hiroshi Kawai, pela orientação neste trabalho como também pelo convite de estudar na Universidade de Kobe, pelas aulas de macroalgas, biologia molecular, pelos contatos e pelo espaço cedido no laboratório da KURCIS, Universidade de Kobe, Japão.

Ao Professor Doutor Hanyuda Takeaki, pela co-orientação neste trabalho, pela paciência em me ensinar as minuciosas e meticulosas técnicas de identificação molecular de espécies, sobre taxonomia de macroalgas verdes e pela amizade durante o período de intercâmbio no laboratório da KURCIS, Universidade de Kobe, Japão.

Aos colegas de laboratório da Universidade de Kobe, verdadeiros “sempais”: Nini-san, Lim-san, Shimono-san, Kogishi-san, Yamada-san, Kato-san, Uai-san, Ushihara-san, Tanaka-san e Yamagishi-san pela amizade e pelas dicas na ficologia.

À província de Hyogo e ao programa HUMAP em especial Seiji Yashiro, pelo apoio financeiro

À Professora Doutora Franciame Pellizzari, pela correção parcial da monografia, dicas e conversas sobre taxonomia e pelo aceite de da avaliação da monografia

À Professora Doutora Mariana Cabral de Oliveira pela avaliação da monografia

À todos que tornaram possível o meu intercâmbio para o Japão, em especial os professores Eduardo Marone, Eunice da Costa Machado e Maurício Camargo

Aos amigos e colegas de Pontal, em especial: Rena, Gui, Rico, Fiux, Marcela, Gustavonês, Felipe, Vader, Breno, Flávio, Tiago, Ale, Paula, Tami, Lami, Ana véia, Fabi, Ricardo, Leo, Lincoln, Lua, Tai, Ana, Roger, Paja, Guigo e todos os outros que aqui esqueci de mencionar.

RESUMO

As espécies do gênero *Ulva* Linnaeus, uma das mais amplamente distribuídas e estudadas macroalgas verdes no mundo são difíceis de distinguir por características fenotípicas. Caracteres morfológicos como tamanho, distribuição e formas celulares, protuberâncias marginais das frondes, reprodução e números de pirenóides são usadas para diferenciação inter-específicas de *Ulva*. Entretanto análises usando marcadores moleculares tornaram-se uma ferramenta complementar para delimitar e identificar essas algas verdes. Na Baía de Osaka, o intenso fluxo de navios provenientes de varias regiões do mundo e a orla modificada por ação antrópica torna-se um habitat favorável para espécies invasoras. No presente estudo, as algas do gênero *Ulva* foram identificadas a partir de análises moleculares da região ITS1 do rDNA como também o desenvolvimento de uma metodologia de identificação específica molecular mais simples, rápida e de menor custo usando Enzimas de Restrição (PCR-RFLP) no ITS1 do DNA ribossômico. As amostras foram coletadas de sete pontos pré-determinados na porção Norte-Noroeste da Baía de Osaka, Japão, entre os meses de fevereiro de 2006 e março de 2007. O protocolo CTAB de extração do DNA algal e o kit DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) de extração de plantas foram comparadas. Os resultados das análises de biologia molecular da região ITS1 do DNA ribossômico mostraram 10 espécies diferentes de *Ulva* na Baía de Osaka: *Ulva arasaki* Chihara, *U. californica* Wille, *U. compressa* Linnaeus, *U. fasciata* Delile, *U. flexuosa* Wilfen, *U. linza* Linnaeus, *U. ohnoi* Hiraoka & Shimada, *U. pertusa* Kjellman, *Ulva* sp. (*scandinavica*?) e *U. tanneri* Hayden & Waaland. Dentre essas elas, as espécies *Ulva arasaki*, *U. californica*, *U. flexuosa* e *Ulva* sp. (*scandinavica*?) foram reportadas pela primeira vez na Baía de Osaka. A metodologia utilizando Enzimas de Restrição (PCR-RFLP) mostrou resultados significativos e comparada ao seqüenciamento genético da região ITS1 do rDNA foi de menor dificuldade e custo além de despende menos tempo, sugerindo como uma nova ferramenta taxonômica para ser utilizada em combinação com as existentes para um monitoramento ambiental de espécies de *Ulva*.

Palavras-chave: Macroalgas verdes. *Ulva*. Seqüências gênicas do ITS1 rDNA. PCR-RFLP. Identificação genética. Ulvophyceae.

ABSTRACT

The species of *Ulva* Linnaeus genus, one of the most widely distributed and studied green seaweeds in the world, is difficult to distinguish because of the plasticity of the phenotypic characters. Morphological characters such as cell sizes, arrangement and shapes, marginal tooth-like protuberances, reproduction and number of pyrenoids were commonly used to differentiate species, however, molecular analysis turned a complementary tool to delimit and identify these green algae. In Osaka Bay, the intense stream of cargo ships proceeding for many countries and the modified maritime edge by human action turn to be an ideal habitat for foreign species. In this study, the genus *Ulva* was identified based on molecular analysis of ITS1 sequences of rDNA. Moreover, the development of a quickly and easily species identification method was made using Restriction Enzymes (PCR-RFLP) in the ITS rDNA region. Samples were collected from 7 pre-determined sites in the north and northwest portion of Osaka Bay, Japan, at a period of February 2006 to March 2007. DNA extraction of plants using CTAB protocol and DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) were also compared. The results of molecular analysis in the ITS1 rDNA region of samples collected showed 10 species of *Ulva* in Osaka Bay: *Ulva arasaki* Chihara, *U. californica* Wille, *U. compressa* Linnaeus, *U. fasciata* Delile, *U. flexuosa* Wilfen, *U. linza* Linnaeus, *U. ohnoi* Hiraoka & Shimada, *U. pertusa* Kjellman, *Ulva* sp. (*scandinavica*?) and *U. tanneri* Hayden & Waaland. Among those species, *Ulva arasaki*, *U. californica*, *U. flexuosa* and *Ulva* sp. (*scandinavica*?) were firstly reported at the Osaka Bay. Restriction Enzymes (PCR-RFLP) method showed trustworthy results and demonstrated that this method is more quickly, easily and with lower cost comparing with ITS rDNA sequencing method, suggesting to use this methodology in a monitoring program of *Ulva*.

Key words: Green Seaweeds. *Ulva*. ITS1 rDNA sequences. PCR-RFLP. Genetic identification. Ulvophyceae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – BIOINCRUSTRAÇÃO DE <i>Ulva</i> sp. NO CASCO DE UM NAVIO TRANSOCEÂNICO CARGUEIRO JAPONÊS.....	9
FIGURA 2 – MAPA DA BAÍA DE OSAKA (JAPÃO) E OS PONTOS DE COLETA DE <i>Ulva</i> spp. PARA ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	25
FIGURA 3 – PONTOS DE COLETA.....	26
FIGURA 4 – HÁBITO GERAL DA PLANTA <i>Ulva linza</i> (a) DE NISHINOMIYA /UNM20070205-08 E DA <i>Ulva californica</i> (b) E DE NISHINOMIYA/UNM20070205-09; IMAGEM DA CORTE TRANSVERSAL DISTROMÁTICA (c) E DO TALO (FIGURA 8) DA <i>Ulva</i> <i>californica</i> / UAW20061213-4.....	36
FIGURA 5 – CORTE TRANSVERSAL DO TALO(a E b) E VISTA FRONTAL DAS CÉLULAS (c E d) DE <i>Ulva pertusa</i> /U20070219-1.....	37
FIGURA 6 – IMAGENS DIGITALIZADAS DA DIGESTÃO DAS ENZIMAS NO GEL DE AGAROSE APÓS A ELETROFORESE DA <i>Ulva</i> sp.1.	41
FIGURA 7 – FOTOGRAFIAS DIGITALIZADAS DO GEL DE AGAROSE SOB RAIOS UV NA CÂMARA ESCURA CONTENDO AS AMOSTRAS DIGERIDAS.....	43
FIGURA 8 – AS ESPÉCIES IDENTIFICADAS NOS LOCAIS AMOSTRADOS ENTRE FEVEREIRO E AGOSTO DE 2006, JUNTAMENTE COM O MÊS E ANO QUE FOI REALIZADA A AMOSTRAGEM.....	46
FIGURA 9 – RELAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS AMOSTRADOS REFERENTE AOS MESES DE NOVEMBRO E DEZEMBRO DE 2006.....	46
FIGURA 10 –RELAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS AMOSTRADOS REFERENTE AOS MESES DE FEVEREIRO E MARÇO DE 2007.....	47

LISTA DAS TABELAS

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR.....	22
TABELA 2 – PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR AS REGIÕES DO ITS1 DE <i>Ulva</i>	30
TABELA 3 – LISTA DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO USADAS NO MÉTODO PCR-RFLP NO PRESENTE ESTUDO.....	32
TABELA 4 – COMPARAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO HÁBITO DE ALGUMAS AMOSTRAS COLETADAS ENTRE AS ESPÉCIES <i>U. linza</i> E <i>U. californica</i>	36
TABELA 5 – TABELA GERADA A PARTIR DAS ESPÉCIES ENCONTRADAS POR NAKAMURA <i>et al</i> (2007) NA BAÍA DE OSAKA E COM AS ENZIMAS RESTRITIVAS ESCOLHIDAS E/OU DESENHADAS PARA O PRESENTE ESTUDO. A COMBINAÇÃO DA DIGESTÃO DESSAS ENZIMAS RESULTAM NA IDENTIFICAÇÃO DAS 10 ESPÉCIES REPORTADAS.....	40
TABELA 6 – PADRÃO DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA REFERENTE A <i>Ulva tanneri</i> ..	41
TABELA 7 – RELAÇÕES DAS ESPÉCIES UTILIZADAS COMO BASE PARA O MÉTODO PCR-RFLP COM SEUS RESPECTIVOS LOCAIS DE COLETA E NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK.....	42
TABELA 8 – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS IDENTIFICADAS PELOS DOIS MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO.....	44
TABELA 9 – AMOSTRAS SELECIONADAS PARA O ARMAZENAMENTO NO BANCO GENÉTICO DA KURCIS.....	48
TABELA 10 – ESQUEMA DAS VANTAGENS E DESVANTAGEM DE CADA MÉTODO DE ANÁLISE MOLECULAR.....	58

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
1.1 O GÊNERO <i>Ulva</i> Linnaeus (1753).....	12
1.2 FILOGENIA DO GÊNERO <i>Ulva</i> : DISTINÇÃO MORFOLÓGICA VS. ASPECTOS MOLECULARES.....	15
1.3 BIOINVASÃO: BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE MONITORAMENTO AMBIENTAL.....	19
1.4 JUSTIFICATIVAS PARA O PRESENTE ESTUDO.....	21
1.5 OBJETIVOS.....	23
1.5.1 Objetivo Geral.....	23
1.5.2 Objetivos específicos.....	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1 ÁREA DE ESTUDO E LOCAIS AMOSTRADOS.....	24
2.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	27
2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	28
2.3.1 – Amostras para seqüenciamento.....	29
2.3.2 – Identificação genética usando a metodologia PCR-RFLP com enzimas de restrição.....	30
2.3.3 – Tratamento dos dados do seqüenciamento.....	33
2.4 – Meio de cultura.....	33
2.5 – Exsiccatas.....	33
3 RESULTADOS	35
3.1 OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	35
3.2 – ANÁLISES GENÉTICAS.....	38
3.2.1 – Extração de DNA.....	38
3.2.2 – Identificação de espécies de <i>Ulva</i> na Baía de Osaka através do seqüenciamento genético utilizando o marcador molecular da região ITS1 do DNA ribossômico.....	38
3.2.3 – O método de identificação molecular inter-específica PCR-RFLP utilizando enzimas de restrição para o gênero <i>Ulva</i>	39
3.2.4 – Identificação genética de <i>Ulva</i> spp. na baía de Osaka.....	45

3.3 EXSICATAS.....	47
3.4 MEIOS DE CULTURA.....	48
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO.....	64

1.INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *Ulva* Linnaeus (1753)

As espécies do gênero *Ulva* Linnaeus (1753) pertencentes à Divisão Chlorophyta, Classe Ulvophyceae, Ordem Ulvales e Família Ulvaceae (BOLD & WYNNE, 1978), são amplamente distribuídas pelo mundo tanto em ambientes marinhos, costeiros e estuarinos, como também em ecossistemas de água salobra. Macroalgas verdes com frondes distromáticas mais conhecidas como “alfaces-do-mar”, geralmente são abundantes desde as zonas entre-marés até o infra-litoral, onde fornecem abrigo e nutrientes para fauna de invertebrados e vertebrados marinhos (LOBBAN & HARRISON, 1997). As plantas ocorrem fixadas em diversos tipos de substratos consolidados como costões rochosos expostos às ações das ondas, no sedimento de baías, estuários protegidos ou até flutuando livremente na coluna d’água (HAYDEN & WAALAND, 2004). Atualmente existem cerca de 124 espécies de *Ulva* com a classificação de nome corrente, e mais de 550 espécies catalogadas no banco de dados do Algaebase www.algaebase.org - PHYCOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA. Recentemente, TAN *et al* (1999) e HAYDEN *et al* (2003) propuseram com base em estudos de relações filogenéticas, que a distinção entre os gêneros *Enteromorpha* (algas verdes de forma tubular) e o gênero *Ulva* não é mais válida.

A ontogenia do gênero *Ulva* apresenta ciclo diagenético haplodiplôntico isomórfico. Têm desenvolvimento morfológico e citológico semelhante na fase sexuada e assexuada, sendo que as poucas diferenças estão na fase diplóide gametofítica (gametângia), nas quais os gametas são biflagelados para então depois formar o zoóide quadriflagelado. Na fase haplóide esporofítica os zoósporos já são células quadriflageladas e se locomovem por um curto período de tempo (OHNO, 1993; HAYDEN & WAALAND, 2002).

Espécimes do gênero *Ulva* são resistentes à diversas condições ambientais, e suportam grandes variações de salinidade, temperatura e concentração de nutrientes (FLETCHER, 1996). Porém, em locais de eutrofizados, elas podem reproduzir e crescer rapidamente, ocasionando um fenômeno ambiental conhecido como marés verdes ou em inglês “green tides”, causando grandes acúmulos de biomassa das algas em praias rasas de baías calmas (SHIMADA *et al*, 2003). Este fenômeno é causado geralmente pelo excesso de nutrientes disponíveis na coluna d’água, fornecendo assim condições ideais para as espécies de *Ulva* e de outros gêneros como *Monostroma* e *Ulvaria* de talo flutuante se multiplicarem rapidamente (NELSON, *et al* 2003a). FLETCHER (1996), MALTA *et al* (1999), BLOMSTER *et al* (2002), NELSON *et al* (2003b) SHIMADA *et al* (2003) observaram a ocorrência de “marés verdes” em vários pontos ao redor do mundo, como Europa, América do norte (noroeste da costa do pacífico) e no Japão. O desencadeamento deste fenômeno tem causado alguns problemas ambientais nesses locais, como a emissão maus odores proveniente do acúmulo de *Ulva* spp. e a morte de alguns organismos marinhos por falta de oxigenação e alta eutrofização. (KUDO & NOTOYA, 1999).

O cultivo de *Ulva* não é muito difundido, entretanto algumas espécies são muito apreciadas na culinária japonesa. Um exemplo é o *aonori* (*Ulva prolifera* O. F. Müller, *Ulva compressa* Linnaeus e *Ulva intestinalis* Linnaeus) como é popularmente conhecido, que geralmente cresce em ambientes de água salobra ou doce nos estuários e baías (OHNO, 1993). O *aonori* é geralmente utilizado como acompanhamento do arroz (tsukudani), ou como também condimento para *okonomiyaki*, que é uma espécie de pizza japonesa, que contem em sua massa repolho, mistura de farinha com temperos e algum tipo de frutos-do-mar ou carne.

1.2 FILOGENIA DO GÊNERO *Ulva*: DISTINÇÃO MORFOLÓGICA VS. ASPECTOS MOLECULARES

Inicialmente, espécies de *Ulva* eram descritas somente por características morfo-anatômicas como tamanho, forma e ordenamento de células, números de pirenóides, espessura e ramificações do talo, coloração do hábito, protuberâncias marginais e textura da fornde, também chamada de talo. Porém, essas macroalgas demonstram uma considerável plasticidade fenotípica em resposta para as condições ambientais (TANNER, 1979 e 1986; DION *et al*, 1998), resultando assim em um grande número de espécies descritas. Entretanto, com a evolução dos estudos taxonômicos foram incrementadas outras características e ferramentas taxonômicas consideradas mais estáveis, incluindo ciclo reprodutivo, desenvolvimento ontogenético e potencial de hibridização em combinação para a classificação das espécies (BLIDING, 1963; TANNER, 1979; HAYDEN & WAALAND, 2004). Porém, a distinção específica nesse genero ainda continuava sistematicamente e taxonomicamente difícil.

O avanço das técnicas de biologia molecular e dos marcadores moleculares a partir da década de 70 com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, na qual foi possível ter acesso a variação gênica do DNA. Logo depois na década de 80, com o surgimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, (PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”). Neste processo dois oligonucleotídeos iniciadores ou “*primers*” cortam e “amplificam” a região do DNA flanqueadas através do aquecimento e/ou resfriamento, sendo possível a cópia do segmento genético em

progressão geométrica (SILVA & SOUZA 2004; KREUZER & MASSEY 2002). A partir disso a biologia molecular tornou-se uma confiável ferramenta para a taxonomia.

Atualmente existem diversas técnicas de análises bio-moleculares e a escolha da metodologia depende do objetivo do estudo. Para um estudo de populações altamente endocruzadas que contenha series repetitivas de bases que variam em número, o tamanho do segmento irá variar entre a população, e o uso dos microssatélites (variações repetitivas de 2 a 5 pares de base) ou minissatélites (repetições de 10 até 20 pares de base) seria o ideal. Todavia, se o objetivo for as comparações inter-específicas, de quando há variação gênica de origem pontual, pode-se utilizar de enzimas de restrição que cortam o segmento por elas reconhecidas, o PCR-RFLP (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism) ou ainda o seqüenciamento gênico que a partir de comparações do código genético de cada espécie para comparação entre elas (SILVA & SOUZA, 2004).

A técnica de PCR-RFLP baseia-se na detecção de RFLPs (polimorfismos de tamanho de fragmentos gerados por enzimas de restrição) envolvendo a fragmentação do DNA genômico, por uma Enzima de Restrição, que pode ser produzida a partir de uma bactéria, nas quais essas enzimas reconhecem e clivam onde ocorre uma seqüência curta de pares de base do DNA, no processo chamado de digestão restritiva. Os fragmentos de DNA resultantes são então separados por tamanhos pelo processo de eletroforese em gel de agarose (KREUZER & MASSEY, 2002).

Os procedimentos mais comuns de seqüenciamento genético até a obtenção dos dados das bases gênicas para a leitura são os usos dos protocolos de extração do DNA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os *primers* selecionados, purificação do produto do PCR com polietilenoglicol (PEG), seqüenciamento através da leitura elétrica dos pares de base (Citosina, Guanina, Timina e Adesina) e finalmente o alinhamento dos dados obtidos através de softwares específicos (GOAT, 1998; KREUZER & MASSEY, 2002). No processo de PCR os marcadores moleculares mais comuns usados para análise molecular do gênero *Ulva* ou algas verdes em geral são: espaçador interno transcrito de evolução rápida do DNA ribossômico nuclear (ITS do inglês Internal Transcribes Spacer do nrDNA) e a maior subunidade do cloroplasto-codificado RUBISCO gene (*rbcL*) (HAYDEN & WAALAND, 2004).

O marcador molecular do espaço interno transcrito de evolução rápida do DNA ribossômico nuclear (ITS nrDNA) se refere a uma pedaço de RNA não-funcional, e está localizado entre um precursor comum transcrito e a estrutura do DNA ribossômico, ou seja, entre dois Espaçadores Transcritos Externos (ETS do inglês External Transcribed Spacers): o 5' e o 3'. Existem dois tipo de ITS: o ITS1 que está localizado entre os espaços transcritos 18S e o 5,8S; o ITS2 que se situa entre os espaços transcritos 5,8S e 18S do DNA ribossômico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). O seqüenciamento da região ITS é amplamente usado nas comparações filogenéticas de plantas, pois tem um alto degrau de variação gênica mesmo entre espécies relativamente próximas. Outra razão na qual é amplamente usada é devido a facilidade de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase),

necessitando-se de pouca quantidade de DNA extraído (KREUZER & MASSEY, 2002).

Entretanto, mesmo com o avanço dessas técnicas moleculares a troca de informações genéticas entre os cientistas continuava difícil. Assim, o governo dos EUA criou em 1988, o Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI, do inglês National Center for Biotechnology Information) como fonte de referência em biologia molecular. Além de criar um banco de dados de acesso público via *internet*, desenvolvendo também pesquisas na área da biologia computacional e faz o intercâmbio com outros centro de pesquisas internacionais com atualizações diárias (KREUZER & MASEEY, 2002; National Center for Biotechnology Information, 2008). Nesse banco de dados incluem além de seqüências de DNA, as seqüências e estruturas de proteínas (*website* www.ncbi.nlm.nih.gov).

Assim, através do uso da engenharia genética como ferramenta taxonômica e filogenético, o índice de identificações equivocadas de espécimens de *Ulva* decresceu, todavia devido ao alto custo, ainda continua sendo pouco usada.

1.3 BIOINVASÃO: BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

O processo de bioinvasão ocasionada por atividades antrópicas ocorre há séculos, muitas vezes por ações não intencionais, como o transporte organismos incrustados nos cascos de embarcações (FIGURA 1), transportes de animais de estimação, organismos para maricultura, aquariofilia, isca e/ou controle biológico, e construções de corredores oceânicos (comportas, canais, etc). Entretanto, atualmente a descarga de água de lastro é considerada a via de maior potencial de introdução de espécies exóticas em portos de todo o mundo (SILVA & SOUZA 2004).

Com a introdução de um organismo ou um grupo de organismos exóticos pode-se afetar dramaticamente esse ecossistema nativo, com conseqüências para estrutura de comunidades, interações inter-específicas e fluxo de energia, podendo ser irreversíveis (BERMAN & CARLTON, 1991). Assim, HOLLAND (2000) ressaltou a importância do uso dos marcadores moleculares como ferramenta crucial para o estudo da bioinvasão, todavia ainda são pouco utilizados devido ao seu alto custo e complexidade. Entretanto esses resultados obtidos a partir de marcadores moleculares requerem cautela na análise e interpretação devido as suas limitações de modelos estruturais desenvolvidos para a genética de populações. Porém o monitoramento ambiental de organismos é imprescindível no controle e gerenciamento do problema, como o conhecimento das espécies endêmicas da fauna e flora (SILVA & SOUZA, 2004).



FIGURA 1 – BIOINCRUSTAÇÃO DE *Ulva* sp. NO CASCO DE UM NAVIO TRANSOCEÂNICO CARGUEIRO JAPONÊS.

1.4 JUSTIFICATIVAS PARA O PRESENTE ESTUDO

No Japão são encontradas 18 espécies de *Ulva*, sendo as mais conspícuas a *Ulva arasaki* Chihara, *U. compressa* Linnaeus, *U. lactuca* Linnaeus e *U. pertusa* Kjellman (YOSHIDA *et al* 2000). Entretanto HANYUDA *et al* (2006) constatou em seu trabalho usando seqüenciamento do marcador ITS1 do DNA ribossômico nuclear, a aparição de algumas espécies de *Ulva* não reportadas na Baía de Osaka. Embora existam alguns estudos taxonômicos com base em características morfológicas (KAWAI, 2001) sobre as macroalgas de Kobe, os dados de biologia molecular ainda continuam pouco explorados na região.

Na Baía de Osaka, o intenso fluxo de navios ao porto provenientes de vários países e a orla extremamente modificada pela ação antrópica, torna-se um habitat ideal para espécies invasoras, principalmente espécies de *Ulva* oportunistas. Alguns casos reportados em HANYUDA *et al* (2006) e KAWAI *et al* (2007), indicam a aparição da espécie *Ulva pertusa* (provavelmente originária da Ásia) na Europa (França), no Pacífico norte (Califórnia) e no Índico sul (Austrália), com o mesmo haplotipo proveniente da parte Sudeste do Japão (ANEXO 1). Isto pode sugerir a ocorrência de um aumento na distribuição e ocorrência dessa espécie pela ação humana.

Devido ao alto custo e meticulosidade das análises de seqüenciamento, o uso de metodologias da análise molecular tornam-se inviáveis para alguns projetos de monitoramento. Desta forma, o presente estudo buscou verificar a viabilidade do uso de técnicas de biologia molecular utilizando o marcador ITS1 como ferramenta para

elaborar um monitoramento ambiental de espécies de *Ulva* não só na Baía de Osaka, mas como também em outras localidades, elaborando e testando uma nova metodologia de identificação molecular mais simples, rápida e menor custo através do método da detecção e fragmentação do DNA genômico pelos polimorfismos de tamanho de fragmentos gerados por enzimas de restrição (PCR-RFLP).

TABELA 1: COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR. Foram utilizados os critérios: variação – quantidade de variação revelada/amostrada pela técnica; custo; amostras – tamanhos amostrais realizados geralmente; interpretação – facilidade de interpretar geneticamente os dados; complexidade – variedade de técnicas e equipamentos diferentes a serem dominados/utilizados no processo.

¹RFLP do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismos de tamanho de fragmentos gerados por enzimas de restrição

²SSCP do inglês Single Strand Conformation Polymorphism – Polimorfismos conformados de fita simples

³RAPD do inglês Random Amplification of Polymorphic DNA – Amplificação Randômica do DNA polimórfico

FONTE: SILVA & SOUZA (2004)

Técnica	Variação	Custo	Amostras	Interpretação	Complexidade
Aloenzimas	Moderada	Baixo	Grande	Difícil	Simple
Microssatélites	Alta	Alto	Médio	Média	Média
Minissatélites	Alta	Alto	Médio	Difícil	Média
RFLP ¹	Moderada	Médio	Médio	Fácil	Média
SSCP ²	Moderada	Médio	Médio	Difícil	Média
Sequenciamento	Alta	Alto	Pequeno	Fácil	Complexa
RAPD ³	Alta	Médio	Médio	Difícil	Simple

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Identificar geneticamente algumas espécies de *Ulva* da parte Norte-Noroeste da Baía de Osaka para contribuir com o banco de dados genéticos da Kobe University Research Center of Inland Seas (KURCIS), e formular uma metodologia de identificação molecular mais acessível e simples que o seqüenciamento genético usando PCR-RFLP (enzimas de restrição), para ser aplicado em um sistema de monitoramento de ambiental de espécies de *Ulva*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Identificar geneticamente espécies de *Ulva* dominante na porção Norte-Noroeste da Baía de Osaka usando o marcador ITS1.
- Comparar protocolos de extração de DNA vegetal.
- Formular uma nova metodologia de identificação molecular de *Ulva* utilizando o PCR-RFLP (Enzimas de Restrição).
- Contribuir com o Herbário da KURCIS depositando exsiccatas das algas coletadas.
- Manter em meios de cultura espécimes de *Ulva* identificadas através da identificação genética na KURCIS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E LOCAIS AMOSTRADOS

A Baía de Osaka (Figura 2) está localizada entre as latitudes 34°50'N e 34°15'N e longitude 134°90'L e 135°30'L e compreende uma área total de 1.500km², com extensão de 60km e largura de 25 km. Banhada pelo Oceano Pacífico, a Baía de Osaka faz parte do complexo de Setonaikai (Mar interno de Seto). A profundidade média da baía é de 27m, entretanto em áreas próximas aos estreitos a profundidade média chega a ser de 60m. As circulações das correntes de marés para fora do sistema da baía ocorrem pela porção ao sul, no estreito de Tomogashima e pela porção leste, no estreito de Akashi (RAJENDRAN 1994).

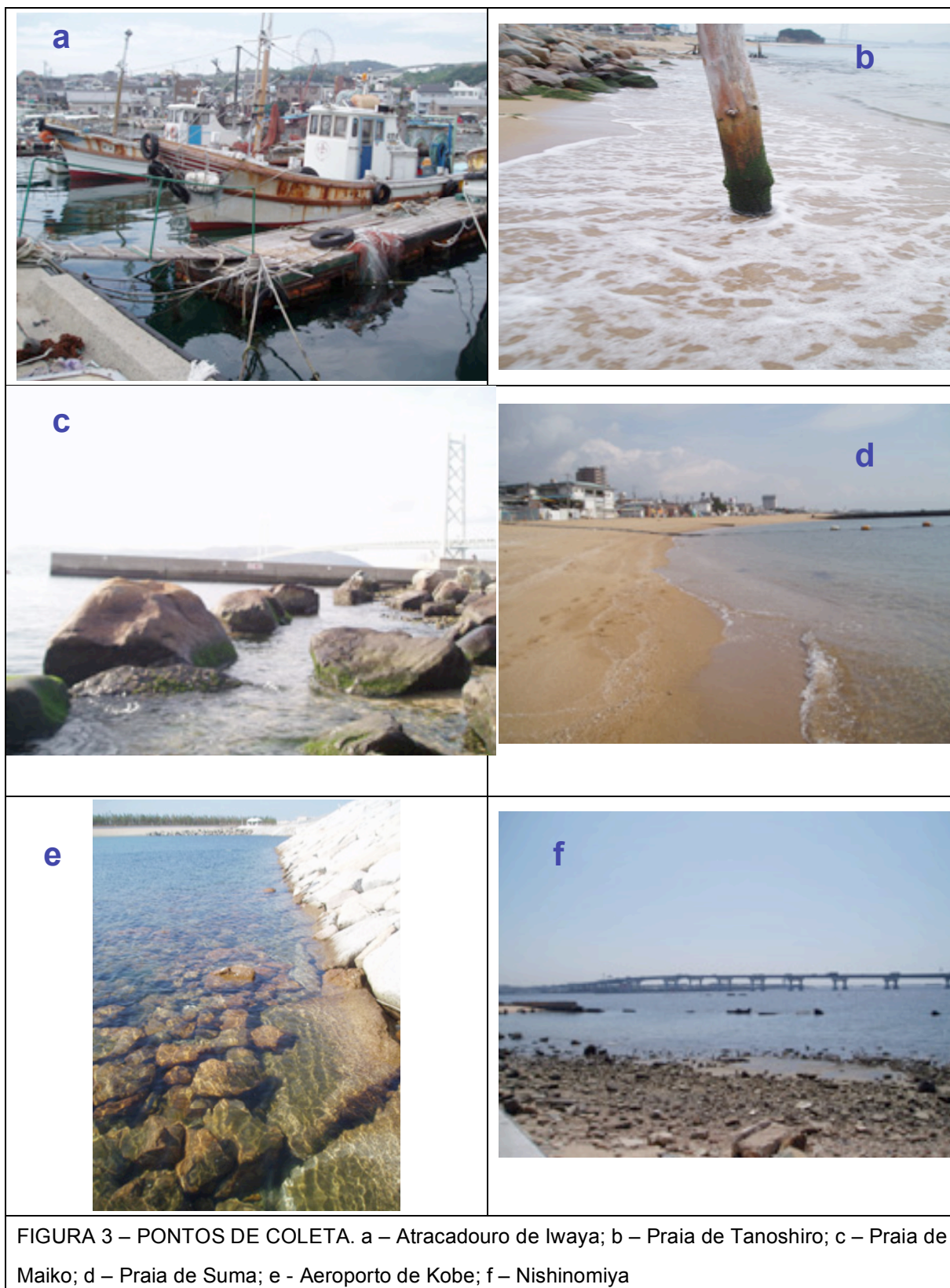
Descargas de efluentes domésticos e industriais são geralmente escoados para a baía por pequenos rios e por dois principais rios: Rio Yodo e Rio Yamato. Essa descarga excessiva de efluentes poluidores tem efeito significativo na formação de uma condição anóxica no fundo dessa baía principalmente durante o verão. Os sedimentos da baía de Osaka são compostos por silte e argila, exceto nas regiões dos estreitos, que é composta por areia (RAJENDRAN 1994). A salinidade pode variar entre 20psu na porção mais interna e 33psu na externa. A temperatura da água pode chegar a 5°C no inverno e 28°C no verão (YUASA *et al*, 1993). Na parte oeste está a Ilha de Awaji, a porção Norte e Leste a área Metropolitana de Kansai. Foram

construídas algumas ilhas artificiais, sendo as principais: Ilha de Rokko, Ilha do Porto, Aeroporto Internacional de Kansai e o Aeroporto de Kobe.

Os locais de coleta de espécies de *Ulva* dominantes situam-se na porção Norte-Noroeste da Baía de Osaka, mais precisamente em sete pontos pré-determinados: três pontos na Ilha de Awaji (Praia de Oiso, Praia de Tanoshiro, Atracadouro de Iwaya), locais de menor impacto antropico na orla, e nas Praias de Maiko, Suma, Nishinomiya e o Aeroporto de Kobe, locais altamente impactados (FIGURA 2; FIGURA 3 a, b, c, d, e e f).



FIGURA 2 – MAPA DA BAÍA DE OSAKA (JAPÃO) E OS PONTOS DE COLETA DE *Ulva* spp. PARA ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR.



As espécies de *Ulva* dominantes foram coletadas trimestralmente durante o período de julho de 2006 a março de 2007, exceto em Nishinomiya, onde foram coletadas somente em agosto de 2006 e fevereiro de 2007 e no Aeroporto de Kobe, onde as coletas foram iniciadas em fevereiro de 2006. Após a separação das espécies de *Ulva* a partir das diferenças morfológicas e avaliação da forma e condições de talo preso ao um substrato ou *free-floating*. Os espécimes foram colocados em uma caixa térmica com gelo e transportadas para o laboratório de análise molecular da Universidade de Kobe. As algas foram lavadas com água corrente doce, e separadas em grupos de diferentes morfologias para a escolha das amostras (n=173). Depois de escolhidas, foram cortadas duas partes da região da fronde com aparência saudável: um para a análise molecular e outra para coleção em meio de cultura da Universidade de Kobe. As amostras para as análises moleculares foram colocadas em sílica gel e o restante foi usado para a elaboração das exsiccatas do herborização do material e posterior depósito na Universidade de Kobe.

2.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Foram tiradas fotografias digitais do hábito geral da planta e fotomicroscopias das frondes e sessão transversal para verificação dos caracteres anatômicos e comparados com estudos pretéritos de BLIDING (1963), TANNER (1986), IIMA & FUKUSUMI (1996), DION *et al.*, (1998), MALTA *et al.*, (1999), TAN *et al.* (1999) e HIRAOKA *et al* (2004).

2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Dois tipos de protocolos foram testados:

- a) o CTAB do inglês Cetyl TrimethylAmonium Bromide, na qual o catiônico Brometo de Cetil-trimetilamônio é usado na solução tampão para a extração de DNA (DOYLE & DOYLE, 1990).
- b) kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN), protocolo para isolamento do DNA total da fronde da planta.

No processo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi dividido em duas fases para maior amplificação da região ITS1 das amostras no Takara PCR Thermal Cycler (TAKARA BIO INC). No primeiro processo de PCR, foi adicionado 0,5 µl do DNA genômico total em 10µl de solução de PCR contendo 7,97µl de água deionizada, 1µl de Reaction Buffer, 0,8µl de dNTPmix a 2,5mM, 0,1µl de cada *primer* usado (TABELA 2) a 20µM e 0,03µl de enzima Ex Taq 5µ/µl. No segundo processo de PCR foi adicionado 0,5µl da solução resultante da primeira PCR em 16µl de solução de PCR contendo 13µl de água deionizada, 1,6µl de Reaction Buffer, 1,3µl de dNTPmix a 2,5mM, 0,2µl de cada *primer* usado a 20µM e 0,05µl de enzima Ex Taq 5µ/µl. Todos os produtos para o PCR exceto a água deionizada foram adquiridos da TAKARA BIO INC. e WAKO NIPPON GENE. O procedimento do termociclador nas duas fases foram: 3 min a 95°C; 3 ciclos da seqüência: 30 sec a 95°C, 30 sec a 60°C e 30 sec a 72°C; 3 ciclos a 58°C, 28 ciclos da seqüência: 30 sec a 95°C, 30 sec a 56°C e 30 sec 95°C; 10 min a 72° C. Tanto no primeiro quanto no segundo processo PCR, foram inseridos controles negativos (sem a presença de amostras de DNA,

somente com soluções tampões) para verificar se houve contaminação das amostras durante o processo.

As amplificações do processo de PCR foram aplicadas em 0,7% em gel de agarose com 0,2µl de brometo de etídio para eletroforese, e logo em seguida colocadas em um câmara com luz UV para serem fotografadas, e verificados o tamanho, a pureza e a produção do fragmento amplificado.

Nas mostras em que verificou-se a amplificação de bandas não reconhecidas, que são geralmente de tamanho de 600 pares-de-base e/ou ocorreu contaminações foram descartadas.

TABELA 2- PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR AS REGIÕES DO ITS1 DE *ULVA* SPP. DA BAÍA DE OSAKA

¹ WHITE *et al* (1990)

² Primers desenhados para este estudo.

<i>Primers</i>	Fw/Rev	Seqüências (5' para 3')	Posição
NS7 ¹	Fw	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	18S
ITS1-U2 ²	Fw	GTCGCTCCTACCGATTGAAC	18S
ITS5-m ²	Fw	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	18S
ITS4-U ²	Rev	TTGAACGTGCTGGTGAAGCG	26S

2.3.1 – Amostras para seqüenciamento

Para melhor rendimento e aproveitamento de leitura do DNA, as amostras de PCR foram submetidas a purificação usando a precipitação por Polietileno glicol (PEG), segundo PASSAMONTI (2006) .

Os produtos purificados do PCR foram seqüenciados seguindo o manual e o protocolo do seqüenciador CEQ8000 (BECKMAN COULTER). As amostras com ruídos excessivos ou contaminações foram descartadas.

2.3.2 – Identificação genética usando a metodologia PCR-RFLP com enzimas de restrição.

Com o pressuposto de desenvolver uma técnica mais simples e relativamente de preço mais acessível comparado ao seqüenciamento genético, foi escolhido utilizar a metodologia PCR-RFLP com enzimas de restrição para distinguir as espécies do gênero *Ulva* através do marcador molecular ITS1. Primeiramente, foram determinadas as espécies dominantes de *Ulva* na Baía de Osaka a partir do seqüenciamento das amostras coletadas durante o período já mencionado anteriormente e com o resultado parcial de espécies de *Ulva* apresentado por NAKAMURA *et al* (2007). Assim, foram escolhidas as 10 espécies de *Ulva* para então determinar as enzimas restritivas produzidas por bactérias que seriam usadas para “fragmentar” os locos gênicos desejados. As enzimas de restrição escolhidas foram: *BamH* I, *BstE* II, *Eco0109* I, *Sal* I, *Sma* I, *BssH* II (WAKO NIPPON GENE) (TABELA 3). Após o PCR, as amostras foram incubadas nas temperaturas conforme cada recomendação descrita para as enzimas restritivas numa solução de 5µl contendo: Água destilada esterilizada (2,4µl para *Sma* I e *BamH* I; 2,1µl para *BssH* II e *Eco0109* I; 2,3667µl para *Sal* I; 2,333µl para *BstE* II), solução tampão (0,5µl), as enzimas de

restrição (0,1 μ l para *Sma* I e *Bam*H I; 0,4 μ l para *Bss*H II e *Eco*0109 I; 0,1333 μ l para *Sal* I; 0,1667 μ l para *Bsf*E II) e o produto do PCR (2 μ l).

Após a incubação as amostras foram colocadas no gel de agarose 0,7% com brometo de etídio (0,2 μ l a cada 80ml de gel) para a eletroforese a 100V durante 25min. Em seguida, o gel contendo as amostras foi colocado numa câmara de raios UV e fotografado para análise.

TABELA 3 – LISTA DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO USADAS NO MÉTODO PCR-RFLP NO PRESENTE ESTUDO.						
Unil/ Amostra	2	2	2	2	2	2
Temp. de incub.	37° C	60° C	37° C	37° C	30° C	50° C
Tempo -	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora
Organismo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ET	<i>Escherichia coli</i> H709c	<i>Streptomyces albus</i> G	<i>Serratia marescens</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> H3
Loco de digestão	5'...G [▼] GATCC...3' 3'...CCTAG [▲] G...5'	5'...G [▼] TNACC...3' 3'...CCANT [▲] G...5'	5'...PuG [▼] GNCCPy...3' 3'...PyCCNG [▲] GPU...5'	5'...G [▼] TCGAC...3' 3'...CAGCT [▲] G...5'	5'...CCC [▼] GGG...3' 3'...GGG [▲] CCC...5'	5'...G [▼] CGCGC...3' 3'...CGCGC [▲] G...5'
Solução tampão	100mM NaCl 10mM Tris-HCL(pH8,5) 10mM MgCl ₂ 1mM 2-Mercaptoethanol	100mM NaCl 50mM Tris-HCL(pH7,5) 10mM MgCl ₂ 1mM DDT	50mM NaCl 10mM Tris-HCl 10mM MgCl ₂ 1mM DDT	100mM NaCl 50mM Tris-HCL(pH7,5) 10mM MgCl ₂ 1mM DDT	50mM Acetato de K 20mM Tris-acetato (pH7,9) 10mM Acetato de Mg 1mM DDT	100mM NaCl 10mM Tris-HCL(pH8,5) 10mM MgCl ₂ 1mM 2-Mercaptoethanol 1mM DDT

2.3.3 – Tratamento dos dados do seqüenciamento

Os softwares de análise e leitura das seqüências genéticas do ITS1 ribossômico utilizados neste presente estudo foram:

- a) 4Peaks para leitura de dados brutos e
- b) DNASIS v3.4 para corrigir o alinhamento por visualização de possíveis erros de leitura do seqüenciador.

As comparações dos resultados obtidos através do método do seqüenciamento genético foram realizadas acessando o *website* do banco mundial genético online, o NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.4 – Meio de cultura

As amostras para o meio de cultura foram mantidas a 15° C em fotoperíodo de 16:8 (E)h, a irradiância de 100 μ M m⁻²s⁻¹ e 8 horas de escuridão. As amostras foram deixadas em água do mar filtrada durante mais ou menos 15 dias até a germinação por esporângia, e transferidas posteriormente para o meio enriquecido com a solução PES a 30% (PROVASOLI, 1968).

2.5 – Exsiccatas

As algas foram herborizadas seguindo a metodologia de KAWAI (2001), que consiste primeiramente em coloca-las em papel cartolina devidamente identificadas com a data, local e coletor das amostras para então serem prensadas com cartolina e

um tecido de algodão ou jornal por cima das frondes, e por fim secadas com o auxílio de um ventilador elétrico.

3 RESULTADOS

3.1 OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS

Algumas espécies como a *Ulva californica* Wille, *U. compressa* Linnaeus, *U. flexuosa* Wulfen, *U. linza* Linnaeus e *Ulva pertusa* Kjellman demonstraram grande plasticidades fenotípicas, porém, em alguns casos ocorreram similaridades morfológicas entre espécies diferentes, como observou-se no caso das similaridades do hábito entre as espécies *Ulva californica* e *U. linza* (FIGURA 4; TABELA 5).

As amostras das espécie *Ulva pertusa* apresentaram grande variedade morfológica do talo, porém, a característica morfológica mais comum na maioria das amostras dessas espécies foi a presença de perfurações na fronde. Entretanto quando analisadas ao microscópio apresentaram número de pirenóides que variaram de 0 a 4, arranjo das células desordenado e formas arredondadas das células (FIGURAS 5 – a, b, c, e d).

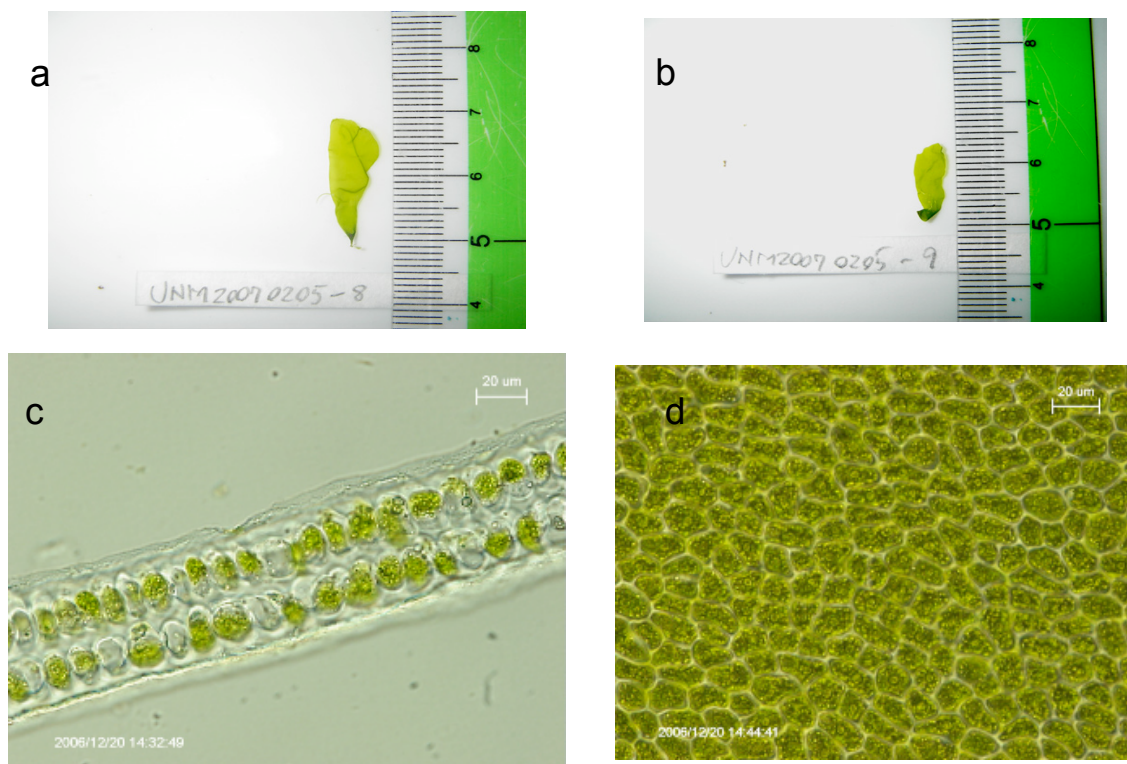


FIGURA 4 – HÁBITO GERAL DA PLANTA *Ulva linza* (a) DE NISHINOMIYA /UNM20070205-08 E DA *Ulva californica* (b) TAMBÉM DE NISHINOMIYA/UNM20070205-09; IMAGEM DA CORTE TRANSVERSAL DISTROMÁTICA (c) E DO TALO (FIGURA 8) DA *Ulva californica*/UAW20061213-4

TABELA 4 – COMPARAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO HÁBITO DE ALGUMAS AMOSTRAS COLETADAS ENTRE AS ESPÉCIES *U. linza* E *U. californica*

Espécie	Coloração	Formato do talo	Textura	Tamanho em cm
<i>U. californica</i>	Verde claro	triangular	Membranosa/fina	2 a 8
<i>U. linza</i>	Verde claro	triangular	Membranosa/fina	1,2 a 15

O tamanho geral das frondes das 173 amostras variaram entre 1cm a 43cm. Todavia as amostras de *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada de talo flutuante (Aeroporto de Kobe) coletadas em agosto de 2006 (U2006824-1 e U2006824-3) tiveram que ser cortadas em campo devido ao seu tamanho anormal de fronde chegando a medir

1,5m, e não cabendo nas sacos plásticos de armazenamento. A coloração da fronde também variou muito entre as espécies coletadas.

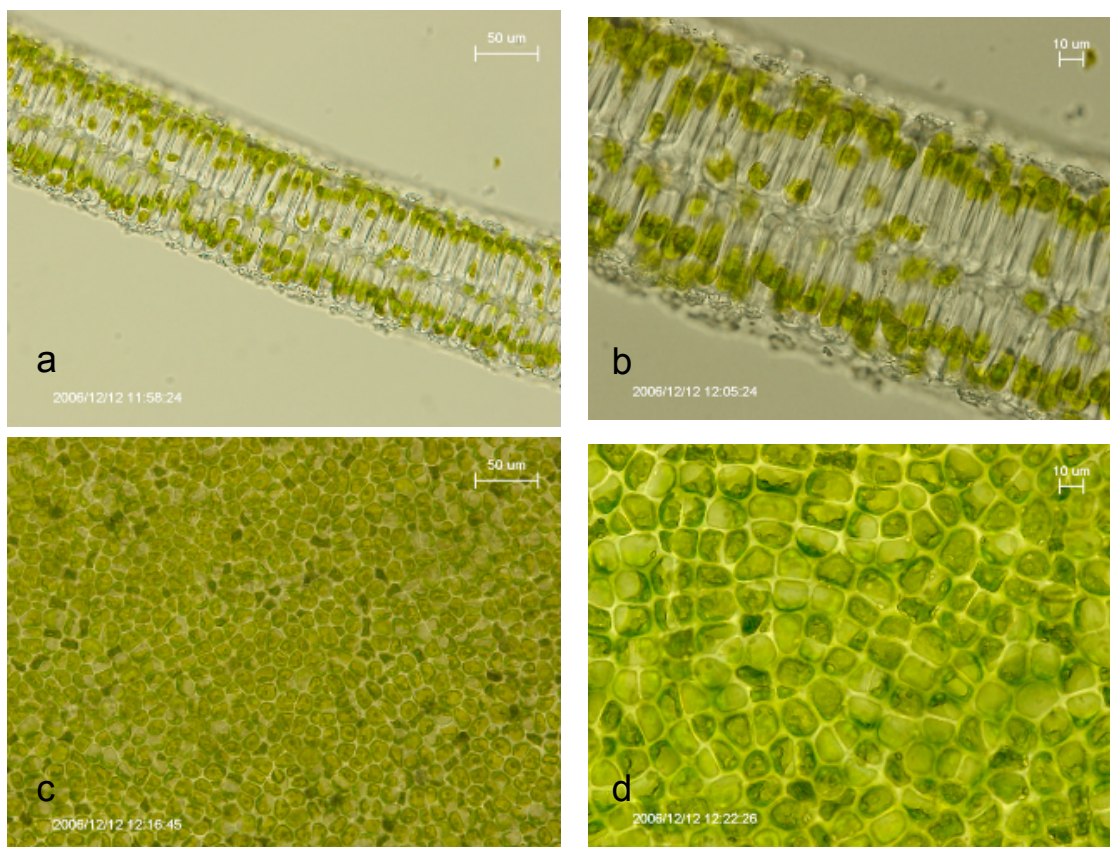


FIGURA 5 – CORTE TRANSVERSAL DO TALO(a E b) E VISTA FRONTAL DAS CÉLULAS (c E d) DE *Ulva pertusa* /U20070219-1

3.2 – ANALISES GENÉTICAS

3.2.1 – Extração de DNA

Para este estudo, não foram observadas diferenças significativas na qualidade de extração do DNA entre os protocolos CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990) e do kit de extração DNeasy Plant Mini (QIAGEN), protocolo de isolamento do DNA total da fronde. Em ambos os casos foi amplificado durante o processo de PCR o segmento de DNA ribossômico ITS1 requerido. Entretanto o protocolo CTAB demonstrou ser um pouco mais demorado, com uma diferença de 25 minutos a mais que o kit da QIAGEN, além da utilização em maior quantidade de tubos de ensaio de 2ml.

3.2.2 – Identificação de espécies de *Ulva* na Baía de Osaka através do seqüenciamento genético utilizando o marcador molecular da região ITS1 do DNA ribossômico

A identificação de 80 amostras das espécies de *Ulva* mostraram a ocorrência de 10 espécies diferentes na porção norte-noroeste da baía de Osaka durante o período de fevereiro de 2006 a novembro de 2006. Essas espécies encontradas são: *Ulva arasaki* Chihara, *Ulva californica* Wille, *Ulva compressa* Linnaeus, *Ulva fasciata* Delile, *Ulva flexuosa* Wulfen, *Ulva linza* Linnaeus, *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada, *Ulva pertusa* Kjellman, *Ulva* sp. (*scandinavica?*) and *Ulva tanneri*

Hayden & Waaland, sendo que dentre essas, as espécies *Ulva arasakii*, *U. californica*, *U. flexuosa* e *Ulva* sp. (*scandinavica*?) foram reportadas pela primeira vez na baía de Osaka.

A *Ulva* sp. (*scandinavica*?) foi definida como espécie não determinada devido a uma pequena diferença haplotípica comparada a espécie reportada na Inglaterra, a *Ulva scandinavica* Bliding (seqüência da região ITS, número de acesso AJ234318 do GenBank).

Os dados obtidos através da identificação pelo seqüenciamento da região ITS1 do rDNA serviram de base para o desenvolvimento e aplicação da metodologia utilizando o PCR-RFLP com enzimas restritivas.

3.2.3 – O método de identificação molecular inter-específica PCR-RFLP utilizando enzimas de restrição para o gênero *Ulva*

Foram analisadas um total de 93 amostras pela metodologia PCR-RFLP utilizando enzimas de restrição. As amostras selecionadas a partir do segundo trimestre foram submetidas as todas as enzimas restritivas, assim obtendo um padrão de resultados nas quais as enzimas digeriram ou não o loco gênico da região ITS1 do DNA ribossômico. Assim obtendo o padrão de digestão das enzimas de restrição, foi possível ter acesso ao resultado de comparação específica do gênero *Ulva* neste estudo, a partir da TABELA 5.

TABELA 5: TABELA GERADA A PARTIR DAS ESPÉCIES ENCONTRADAS POR NAKAMURA ET AL (2007) NA BAÍA DE OSAKA E COM AS ENZIMAS RESTRITIVAS ESCOLHIDAS E/OU DESENHADAS PARA O PRESENTE ESTUDO. A COMBINAÇÃO DA DIGESTÃO DESSAS ENZIMAS RESULTAM NA IDENTIFICAÇÃO DAS 10 ESPÉCIES REPORTADAS. Legenda: X – não digerido; O – digerido apenas em uma banda; O(2) – digerido em 2 bandas.

	<i>Bam</i> H I	<i>Bst</i> E II	<i>Eco</i> 0109 I	<i>Sa</i> I I	<i>Sma</i> I	<i>Bss</i> H II
<i>Ulva arasaki</i>	X	O	X	X	X	X
<i>Ulva californica</i>	X	X	X	O	O	X
<i>Ulva compressa</i>	X	X	X	X	O	O
<i>Ulva fasciata</i>	O	X	O(2)	O	O(2)	O(2)
<i>Ulva flexuosa</i>	X	X	O	O	X	X
<i>Ulva linza</i>	O	X	O	O	O	X
<i>Ulva ohnoi</i>	O	X	O	O	O	O
<i>Ulva pertusa</i>	X	X	X	X	X	O
<i>U. sp (scandinavica?)</i>	O	X	X	O	O	O(2)
<i>Ulva tanneri</i>	X	X	X	O	X	X

A enzima *Eco*0109 foi usada somente quando houveram resultados da digestão do padrão das espécies *Ulva flexuosa* e *U. tanneri*, nas quais as combinações dos resultados das digestões são iguais entre as demais enzimas. Por exemplo: uma amostra (*Ulva* sp.1) digerida pelas enzimas restritivas resulta no padrão da digestão enzimáticas da *Ulva tanneri* Hayden & Waaland como mostra a FIGURA 6 – a e b, e resultam no padrão demonstrado na TABELA 6

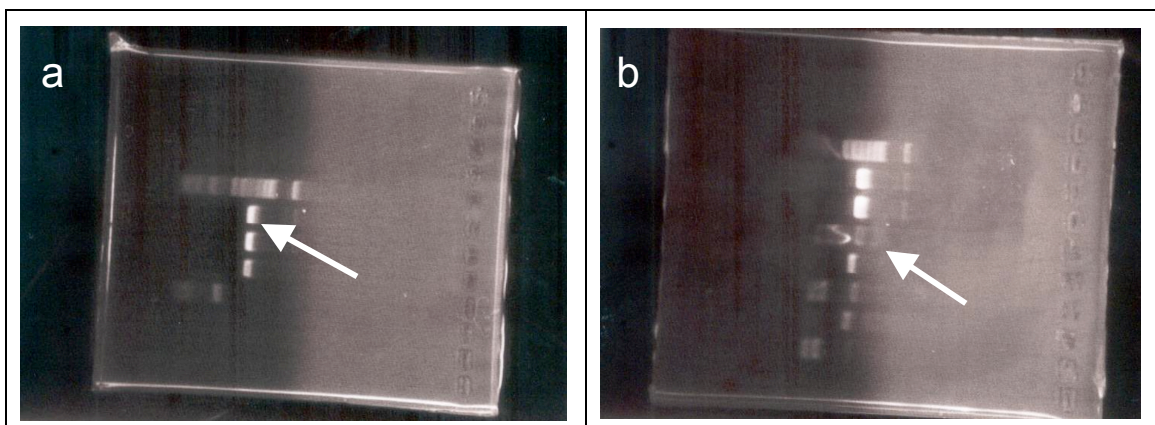


FIGURA 6 – IMAGENS DIGITALIZADAS DA DIGESTÃO DAS ENZIMAS NO GEL DE AGAROSE APÓS A ELETROFORESE DA *Ulva* sp.1. As setas indicativas mostram que a amostra é da espécie *Ulva tanneri* na qual foi submetida as enzimas de restrição *Eco0109 I* (a) e *Sal I* (b) que por final resultaram no padrão da TABELA 6.

TABELA 6 – PADRÃO DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA REFERENTE A *Ulva tanneri*

	<i>BamH I</i>	<i>BstE II</i>	<i>Eco0109 I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Sma I</i>	<i>BssH II</i>
<i>Ulva tanneri</i>	X	X	X	O	X	X

As espécies escolhidas como base sequencial do ITS ribossômico do DNA para então definir o desenho e/ou escolha das enzimas de restrição no presente estudo estão relacionadas na TABELA 7.

Para verificar a veracidade e a confiabilidade da metodologia, foram escolhidas 20 amostras das 93 analisadas pelo método de PCR-RFLP para o seqüenciamento genético, contendo espécimes de diferentes locais e trimestres de coleta.

TABELA 7 – RELAÇÕES DAS ESPÉCIES UTILIZADAS COMO BASE PARA O MÉTODO PCR-RFLP COM SEUS RESPECTIVOS LOCAIS DE COLETA E NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK.

Especies	Local de coleta	Num. GenBank (ITS)
<i>Ulva arasaki</i>	Shizugawa, Miyagi – Japão	AB097650
<i>Ulva californica</i>	La Jolla, Califórnia – EUA	AY260560
<i>Ulva compressa</i>	Portaferry, Strangord Lough – Irlanda do N.	AJ234302
<i>Ulva fasciata</i>	Usa, Kochi – Japão	AB097663
<i>Ulva flexuosa</i>	Shimoda, Shizuoka – Japão	AB097646
<i>Ulva linza</i>	Rio Yoshiro, Tokushima – Japão	AB097649
<i>Ulva ohnoi</i>	Tosa, Kochi – Japão	AB116034
<i>Ulva pertusa</i>	Miyajima, Hiroshima – Japão	AB097656
<i>U. scandinavica</i>	Porto de Langstone, Portsmouth- Inglaterra	AJ234318
<i>Ulva tanneri</i>	Kobe, Hyogo – Japão	AY260556

A metodologia de identificação por PCR-RFLP utilizando enzimas de restrição levou em média 1 dia a menos que o método do seqüenciamento, custando 50% a 66% do valor de uma amostra para seqüenciamento e sendo que esse valor varia com o número de amostras a serem analisadas. Na maioria das espécies identificadas utilizou-se apenas cinco enzimas de restrição para obter o padrão de resultados da digestão ou não das enzimas de restrição como mostra na TABELA 5. *i.e.* as amostras MA20061129-6 e MA20061129-7 mostraram um padrão de digestão da espécie *U. pertusa* (FIGURA 7 – a, b, c, d, e e). Entretanto ao contrário das amostras quem resultaram na combinação de *U. pertusa*, as amostras MA20061129-1, MA20061129-3 e MA20061129-5 resultaram no padrão digestivo da *U. flexuosa* assim sendo necessárias a utilização das 6 enzimas de restrição para a identificação das espécies dessas respectivas amostras (FIGURA 7 – a, b, c, d, e, e f).

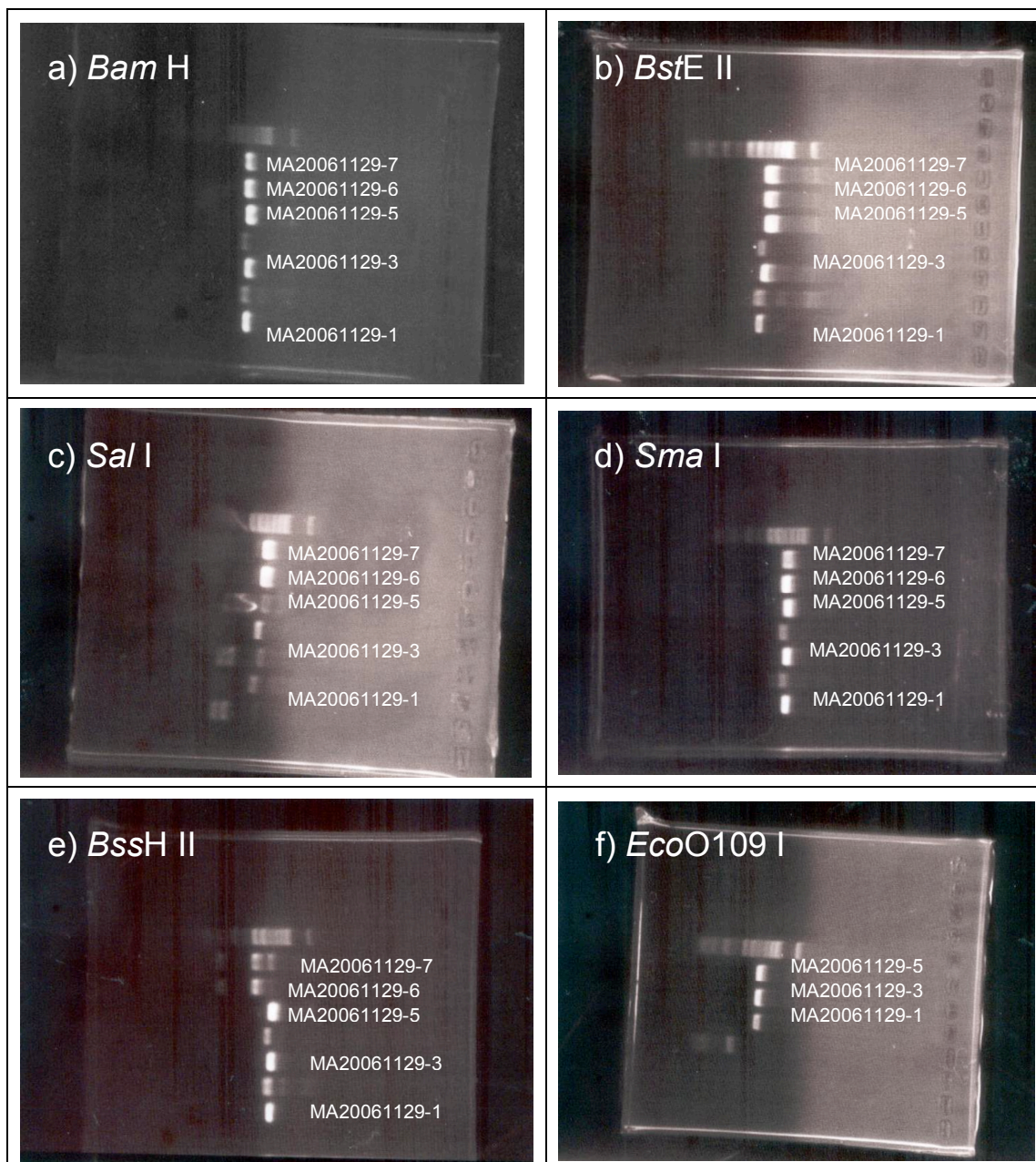


FIGURA 7 – FOTOGRAFIAS DIGITALIZADAS DO GEL DE AGAROSE SOB RAIOS UV NA CÂMARA ESCURA CONTENDO AS AMOSTRAS DIGERIDAS. a - *Bam* H; b – *BstE* II; c – *Sal* I; d – *Sma* I; e – *BssH* II; f – *EcoO109* I. As amostras estão especificadas ao lado de cada banda. Somente as amostras MA20061129-1, MA20061129-3 e a MA20061129-5 foram aplicadas a enzima de restrição *EcoO109* I, pois as combinações coincidem com o padrões da *U. flexuosa* e *U. tanneri*. O resultado foi que essas amostras não foram digeridas pela enzima *EcoO109* I, resultando assim no padrão de digestão da *U. tanneri*.

As 20 amostras escolhidas para a aferição da confiabilidade dessa metodologia estão listadas na TABELA 8, juntamente com o resultados das identificações de espécies pelo método desenvolvido no presente estudo, usando o PCR-RFLP com enzimas de restrição e pelo seqüenciamento da região ITS1 rDNA. Segundo essas informações, essa metodologia mostrou 100% de eficácia nas amostras testadas.

TABELA 8 – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS IDENTIFICADAS PELOS DOIS MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO. Nas amostras de aferição estavam presentes as 10 spp. identificadas na Baía de Osaka pelo método de seqüenciamento.

Amostra/número	Espécie-PCR-RFLP Enz. Res.	Espécie-Seqüenciamento
U2006824-2	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva petusa</i>
MA2006097-6	<i>Ulva californica</i>	<i>Ulva californica</i>
SU2006097-2	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva pertusa</i>
U20061130-1	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva pertusa</i>
UAW20061213-2	<i>Ulva arasaki</i>	<i>Ulva arasaki</i>
UAW20061213-6	<i>Ulva fasciata</i>	<i>Ulva fasciata</i>
UWA20061213-21	<i>Ulva californica</i>	<i>Ulva californica</i>
SU20061129-7	<i>Ulva linza</i>	<i>Ulva linza</i>
MA20061129-1	<i>Ulva tanneri</i>	<i>Ulva tanneri</i>
MA20061129-6	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva pertusa</i>
UNM20070205-1	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva pertusa</i>
UNM20070205-9	<i>Ulva californica</i>	<i>Ulva californica</i>
U20070219-2	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva pertusa</i>
U20070219-8	<i>Ulva linza</i>	<i>Ulva linza</i>
UAW20070222-3	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva pertusa</i>
UAW20070222-6	<i>Ulva compressa</i>	<i>Ulva compressa</i>
UAW20070222-15	<i>Ulva tanneri</i>	<i>Ulva tanneri</i>
U2006824-3	<i>Ulva ohnoi</i>	<i>Ulva ohnoi</i>
SU20070308-1	<i>Ulva sp. (scandinavica?)</i>	<i>Ulva sp. (scandinavica?)</i>
MA20070308-10	<i>Ulva flexuosa</i>	<i>Ulva flexuosa</i>

3.2.4 – Identificação genética de *Ulva* spp. na baía de Osaka

Os resultados do seqüenciamento genético da região ITS ribossômico (no total 80 amostras) foram utilizados em conjunto com os dados do método PCR-RFLP (no total 93 amostras) para a geração dos mapas ilustrativos de ocorrência das espécies de *Ulva* na parte Norte-Noroeste da Baía de Osaka durante o período amostrado. (FIGURAS 8, 9 e 10)

A espécie *Ulva pertusa* foi uma das mais frequentemente avistadas, sendo que em alguns casos como, exemplo em novembro de 2007 no aeroporto de Kobe, das cinco amostras coletadas, todas foram identificadas como a espécie *U. pertusa* (FIGURA 9). Na amostragem do terceiro trimestre também foi observada a presença desta espécie em todas as localidades de coleta (FIGURA 10). Outra espécie que teve uma significativa distribuição dentre as espécies identificadas foi a *Ulva linza*.

A identificação da espécie *Ulva arasakii*, reportada pela primeira vez na baía de Osaka, ocorreu somente na Praia de Tanoshiro, Ilha de Awaji, contrastando com as espécies *Ulva flexuosa* e *Ulva californica*, as quais foram identificadas nas Praias de Maiko e Suma, no atracadouro de Iwaya (Ilha de Awaji), em Nishinomiya e no aeroporto de Kobe. Por outro lado, a identificação da espécie *Ulva* sp. (*scandinavica*) foi reportada nas amostras da Praia de Suma (no continente) e na praia de Oiso (Ilha de Awaji). Entretanto, a espécie *Ulva ohnoi* foi observada somente na coleta de agosto de 2006, realizado no aeroporto de Kobe e em Nishinomiya. O restante das espécies não apresentaram padrões significativos de ocorrência dentre os meses e pontos amostrados.

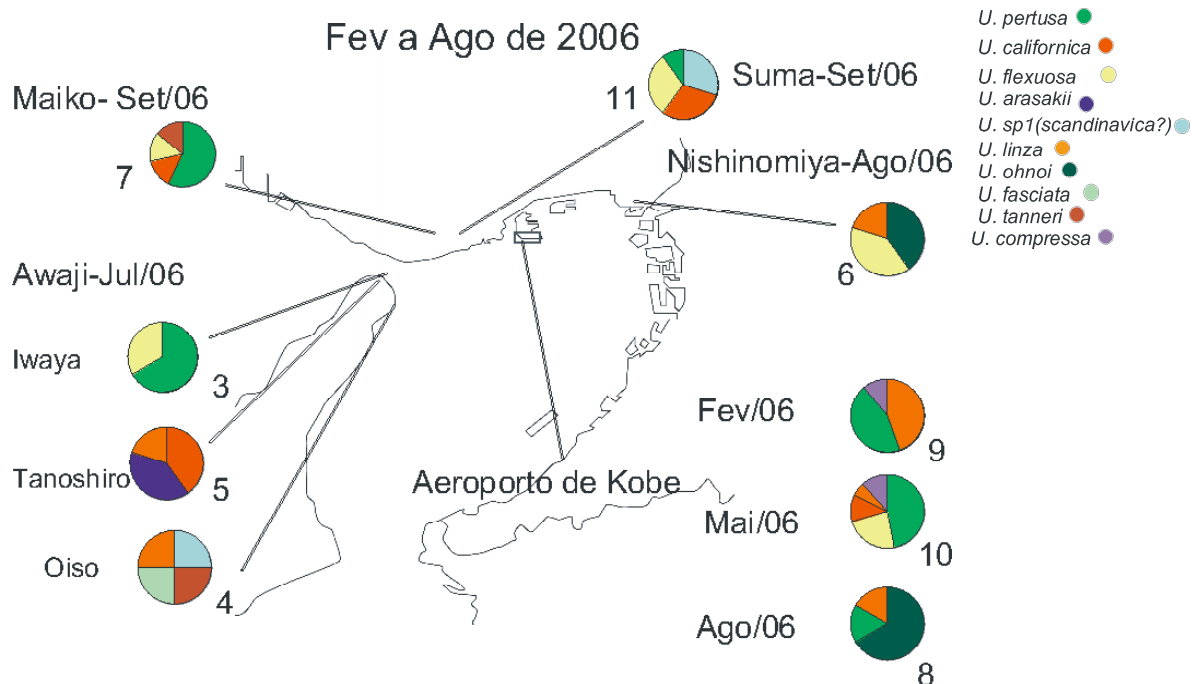


FIGURA 8 – AS ESPÉCIES IDENTIFICADAS NOS LOCAIS AMOSTRADOS ENTRE FEVEREIRO E AGOSTO DE 2006, JUNTAMENTE COM O MÊS E ANO QUE FOI REALIZADA A AMOSTRAGEM. Os números ao lado de cada círculo indicam a quantidade de amostras analisadas molecularmente.

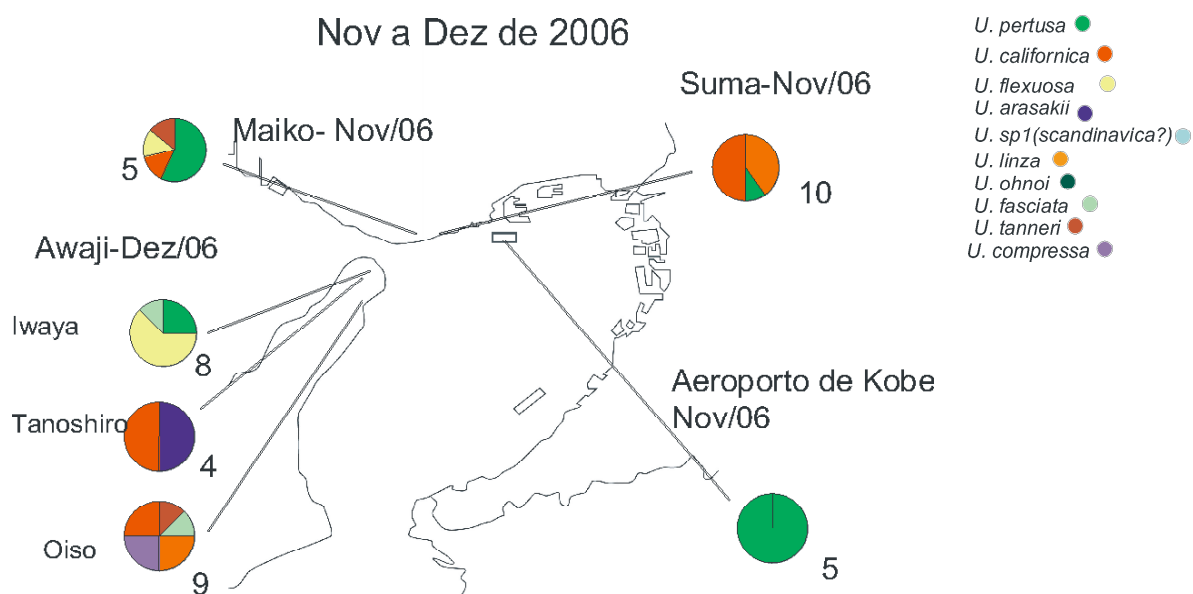


FIGURA 9 - RELAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS AMOSTRADOS REFERENTE AOS MESES DE NOVEMBRO E DEZEMBRO DE 2006.

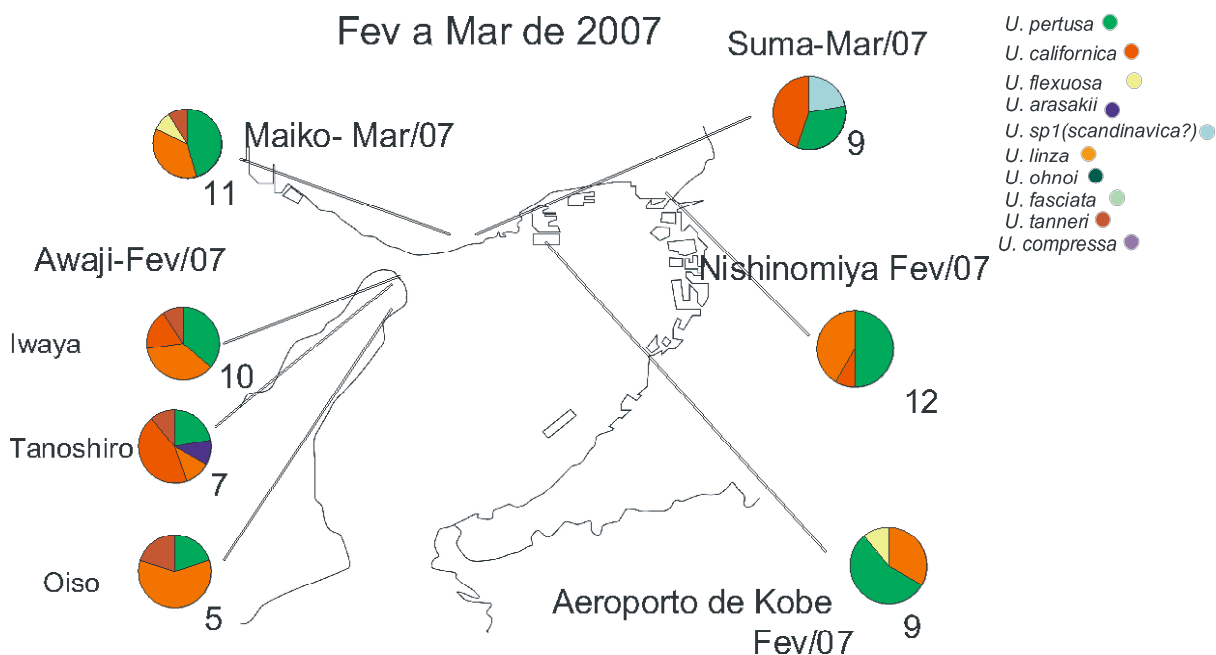


FIGURA 10 - RELAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E LOCAIS AMOSTRADOS REFERENTE AOS MESES DE FEVEREIRO E MARÇO DE 2007.

3.3 EXSICATAS

Algumas exsicatas em duplicata foram selecionadas para fazer parte do herbário da KURCIS, principalmente as espécies de *Ulva* reportadas pela primeira vez na Baía de Osaka entretanto ainda estão em processo armazenamento

3.4 MEIOS DE CULTURA

Foram selecionadas 22 amostras do total para serem futuramente armazenadas no banco genético de macroalgas da KURCIS (Kobe University Research Center of Inland Seas). A relação dessas amostras estão esclarecidas na TABELA 9.

TABELA 9 – AMOSTRAS SELECIONADAS PARA O ARMAZENAMENTO NO BANCO GENÉTICO DA KURCIS. Os números de coleção não representam os números de *voucher* da KURCIS.

Num.	Taxa	Local	Data amost	Amostra	Coletor
CC0001	<i>Ulva arasakii</i>	Tanoshiro, Ilha de Awaji	2006 /jul/14	UAW2006714-2	Nakamura K.
CC0002	<i>Ulva sp (scandinavica)</i>	Oiso , Ilha de Awaji	2006 /jul/14	UAW2006714-7	Nakamura K.
CC0003	<i>Ulva pertusa</i>	Aeroporto de Kobe	2006/ago/24	U2006824-7	Nakamura K.
CC0006	<i>Ulva flexuosa</i>	Suma	2006/set/07	SU200697-8	Nakamura K.
CC0007	<i>Ulva sp (scandinavica)</i>	Suma	2006/set/07	SU200697-4	Nakamura K.
CC0008	<i>Ulva pertusa</i>	Iwaya, Ilha de Awaji	2006 /jul/14	UAW2006714-1	Nakamura K.
CC0009	<i>Ulva ohnoi</i>	Aeroporto de Kobe	2006/ago/24	U2006824-4	Nakamura K.
CC0010	<i>Ulva ohnoi</i>	Aeroporto de Kobe	2006/ago/24	U2006824-10	Nakamura K.
CC0011	<i>Ulva pertusa</i>	Maiko	2006/set/07	MA200697-1	Nakamura K.
CC0012	<i>Ulva pertusa</i>	Maiko	2006/set/07	MA200697-3	Nakamura K.
CC0013	<i>Ulva linza</i>	Tanoshiro, Ilha de Awaji	2006 /jul/14	UAW2006714-5	Nakamura K.
CC0014	<i>Ulva californica</i>	Maiko	2006/set/07	MA200697-6	Nakamura K.
CC0015	<i>Ulva flexuosa</i>	Maiko	2006/set/07	MA200697-7	Nakamura K.
CC0016	<i>Ulva ohnoi</i>	Aeroporto de Kobe	2006/ago/24	U2006824-8	Nakamura K.
CC0017	<i>Ulva flexuosa</i>	Aeroporto de Kobe	2007/fev/19	U2007219-6	Ushihara Y.
CC0018	<i>Ulva tanneri</i>	Oiso, Ilha de Awaji	2006 /jul/14	UAW2206714-9	Nakamura K.
CC0019	<i>Ulva tanneri</i>	Maiko	2006/set/07	MA200697-2	Nakamura K.
CC0020	<i>Ulva ohnoi</i>	Nishinomiya	2006/ago/25	UNM2006825-1	Nakamura K.
CC0021	<i>Ulva flexuosa</i>	Nishinomiya	2006/ago/25	UNM2006825-2	Nakamura K.
CC0022	<i>Ulva sp (scandinavica)</i>	Suma	2006/set/07	SU200697-5	Nakamura K.

4. DISCUSSÃO

As características morfológicas das espécies de *Ulva* demonstraram uma grande plasticidade, dificultando a definição e a separação das amostras a serem coletadas no campo. A partir da metodologia de coleta na qual frisou amostrar espécimes de morfologias distintas utilizadas neste estudo, não foi possível estimar o número amostral de espécies existentes no local devido as similaridades entre frondes. Porém, foi possível observar os morfotipos mais conspícuos e/ou freqüentes. Essa dificuldade de distinguir espécies de *Ulva* pode acarretar numa identificação errônea de espécies, como foi observada após os resultados obtidos por análise molecular da região ITS1 do rDNA.

Alguns autores como TANNER (1986), IIMA & FUKUSUMI (1996), TAN *et al* (1999) e SHIMADA *et al* (2003) observaram em que em condições de crescimento em cultura a macroalga verde com frondes distromáticas têm desenvolvimento estrutural e morfológicos diferentes, afirmando assim que as condições ambientais são de suma importância para a morfologia da *Ulva*. TANNER (1986) apontou que a espécie *Ulva californica* muda completamente sua morfologia do talo em condições de presença ou ausência de ondas. Por outro lado, neste presente estudo, a morfologia da *U. californica* segundo TANNER (1986) apresentou o talo característico de áreas protegidas como estuários e baías. Entretanto, na Praia de Suma um dos locais onde foi identificada essa espécie, ocorreu em uma área exposta a ação das ondas.

TAN et al (1999) observou que a salinidade pode ser um dos fatores para que espécies de *Ulva compressa* orientando a característica morfológica de ser tubular ou não no desenvolvimento morfológico. Todavia, nesse estudo, observou-se que em amostras de *U. compressa* amostradas do mesmo ponto amostral e época do ano tiveram diferentes morfologias do talo, sendo que uma tubular e outra de talo aberto. Esse autor ainda ressalta a possibilidade da presença ou ausência de uma bactéria pode ter fundamental peça para o entendimento dessas macroalgas possuírem ou não talos tubulares a partir do início do desenvolvimento ontogenético.

No caso da *Ulva ohnoi*, foi observada a coloração verde escura, contrariando a característica de coloração adotada por HIRAOKA *et al* (2004), como também não foi verificada a presença de protuberâncias marginais. Entretanto na *Ulva fasciata*, verificou-se a presença dessa protuberâncias marginais no talo.

A *Ulva linza* mostrou sua característica morfológica muito parecida com a espécie *Ulva californica* neste presente estudo. Porém, a *U. californica* não havia sido reportada na Baía de Osaka até então. Uma possibilidade de ter sido detectada somente nesse estudo através das análises moleculares, é a de que anteriormente essa espécie tenha sido confundida com a *U. linza*, devido ao seu talo ser de forma triangular com folhas membranosas.

A maioria das amostras de *Ulva pertusa* apresentavam furos em suas frondes, como conseqüência da herbivoria de alguns organismos presentes no ecossistema ao redor (FLETCHER, 1996). Mas outras espécies também apresentaram esse tipo de característica, como a *Ulva ohnoi*, *Ulva* sp. (*scandinavica*?) e *Ulva arasakii*.

A análise das comparações microscópicas de todas as amostras não foi realizada devido a necessidade de uma quantidade razoável do talo de cada espécime para o preparo da sessão transversal e do talo para ser fotografado. Uma alternativa usada freqüentemente por vários autores como TANNER (1979), IIMA & FUKUSUMI (1996) e HIRAOKA *et al* (2004) é a da utilização do meio de cultura como ferramenta para o crescimento das algas para as análises de caracteres microscópicos

São tantas as divergências de características de diversos autores como DION *et al* (1998) e TAN *et al* (1999) propõem que para se tentar identificar morfologicamente deve-se aplicar uma combinação de caracteres morfológicos do talo, como também do tecido citológico dessas macroalgas, já que não existe nenhuma característica única de distinção inter-específica. Contudo ainda concordam que mesmo com essa combinação de caracteres a identificação pela morfologia requer muito cuidado.

A distinção pelo ciclo de vida e pelas ramificações de talo observadas no meio de cultura podem se tornar uma ferramenta importante para a distinção de espécies no gênero *Ulva*, porém a demanda de material específico para o meio de cultura, como câmaras de cultivo com controle de luz e temperatura, materiais e soluções para os meios de cultura acabam encarecendo e tornando o processo de identificação um tanto quanto minucioso e demorado.

Metodologias de extração do DNA vegetal

Ambas as metodologias mostraram-se eficazes para amplificação da região do ITS1 do rDNA no método PCR. Algumas diferenças foram notadas durante os protocolos do laboratório QIAGEN e o protocolo CTAB elaborado por DOYLE & DOYLE (1990), todavia nos dois procedimentos requerem equipamentos como centrífugas de alto poder de rotação (mínimo de 12.000 rotações por minuto) com sistema de refrigeração e aquecedores de amostra com precisão na temperatura.

O kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN) mostrou-se um pouco mais prático que o CTAB (Brometo de CetilTrimetilAmônio), devido a todos os reagentes já virem separados ou prontos para misturas entre si, como também no kit está contido tubos de filtração e precipitação. O método CTAB era mais dispendioso, tendo de realizar as misturas das soluções tampões para então ser utilizadas durante o processo de extração. Em média a extração do DNA vegetal pelo kit extraíndo 16 amostras demandava aproximadamente em torno de 1 hora e 35 minutos para ser completado, contrastando com o método CTAB, também com 16 amostras demorava uma média de 2 horas.

A principal diferença entre os dois protocolos foi o valor. O custo médio do kit da QIAGEN com capacidade de extração para 250 amostras é 100% maior que o protocolo CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990), na qual custava a metade com o mesmo número de amostras, devido a necessidade somente dos reagentes químicos e tubos plásticos de ensaio de 3ml.

Identificação genética na parte norte-noroeste da Baía de Osaka

As espécies *Ulva arasakii*, *Ulva compressa*, *Ulva lactuca* e *Ulva pertusa* são as mais conspícuas no Japão dentre as 18 spp do gênero *Ulva* identificadas por YOSHIDA *et al* (2000). Entretanto HANYUDA *et al* (2006) identificou geneticamente pela região ITS na Baía de Mika, duas novas espécies ainda não reportadas no Japão: *Ulva californica* e *Ulva scandinavica*. Essas duas espécies também foram identificadas no presente estudo, como também a aparição das espécies *Ulva flexuosa* e *Ulva arasakii*, ainda não reportadas na Baía de Osaka. Provavelmente, essas 4 espécies identificadas geneticamente pela primeira vez em Osaka devem ter sido identificadas equivocadamente como outras espécies a partir de caracteres morfológicos. Uma prova disso seria que HANYUDA *et al* (2006) através de testes moleculares da região ITS encontrou um haplotipo diferente da originária da costa noroeste do Pacífico. O mesmo haplotipo da *U. californica* da baía de Osaka foi encontrado na baía de Mika. Isso sugere que se essa espécie provém de outro lugar, o espécime encontrado no Japão teve tempo suficiente para sofrer mutações que acarretaram nessa diferença genômica. (KAWAI, 2007)

A identificação genética de *U. ohnoi* em Nishinomiya e no Aeroporto de Kobe em agosto de 2006 condiz com as afirmações feitas por HIRAOKA *et al* (2004), na qual sugere que a aparição dessa espécie se torna mais evidente quando a temperatura da água do mar está mais quente.

A aparição de um haplotipo diferente de *Ulva scandinavica* (nesse estudo chamado de *U. sp*) põe em questão se essa espécie já esta inserido há um longo

período na Baía de Osaka como a *U. californica*, o que na verdade não seria uma novidade, pois o intenso fluxo portuário da região contribui para ser considerada uma área de risco para bio-introduções a partir da água de lastro ou incrustadas em cascos de navios. Estudos com microssatélites para verificar a taxa de mutação entre a população dessa espécie seriam uma ferramenta crucial para o entendimento das origens e/ou introduções não só dessa espécie, mas como também de populações da espécie *U. californica*.

Recentemente os esforços para o melhor entendimento da origem das espécies estão aumentando devido aos grandes casos de bio-introdução e bio-invasão de origem antrópica. Estudos como os de HAYDEN & WAALAND (2004), HAYDEN *et al* (2003), TAN *et al* (1999), BLOMSTER *et al* (2002), HANYUDA *et al* (2006), SHIMADA *et al* (2003) e HIRAOKA *et al* (2004) são de extrema relevância para o entendimento das relações filogenéticas existentes entre as espécies de *Ulva*.

O método de identificação de *Ulva* usando PCR-RFLP com enzimas de restrição

A metodologia testada neste presente estudo teve um resultado totalmente satisfatório, tendo 100% de acerto dentre as amostras testadas com o seqüenciamento. Segundo SILVA & SOUZA (2004), métodos de identificação molecular como este seriam de grande valia para um monitoramento de organismos, entretanto uma cautela na interpretação de dados seria necessária devido a complexidade das informações obtidas através das análises moleculares.

Os dados obtidos através identificação de *Ulva* por PCR-RFLP com enzimas restritivas mostraram que esse novo método de análise molecular pode ser facilmente aplicado e interpretado. Através da combinação de resultados da digestão das 6 enzimas de restrição usadas sobre as amostras de PCR das macroalgas, a visualização das espécies é facilmente identificadas com a ajuda da tabela matriz dos dados desse método.

Mais rápido que o seqüenciamento e com o custo menor, o tempo médio das análises foi reduzido em aproximadamente 50%, favorecendo projetos nas quais demandam de um “n” amostral grande, pouco tempo e orçamento limitado. Entretanto para aplicar essa metodologia necessita-se de uma base de informações prévias das espécies de *Ulva* existentes no local, para o desenho e escolha das enzimas de restrição.

Pode-se testar essa metodologia com as enzimas já utilizadas neste presente estudo, todavia o sucesso da identificação por esse método ficará comprometido devido a incompatibilidade do uso dos *primers* e/ou enzimas de restrição no loco gênico desejado. Um maior “n” amostral como também a utilização de mais espécies como base trariam a essa nova metodologia um pouco mais de confiabilidade, entretanto a interação do uso de ferramentas taxonômicas morfológicas com as de biologia molecular como o seqüenciamento continua sendo a mais aconselhável.

A TABELA 10 mostra um resumo esquemático das vantagens de desvantagens dos dois métodos de identificação molecular de espécies usadas nesse estudo.

TABELA 10 – ESQUEMA DAS VANTAGENS E DESVANTAGEM DE CADA MÉTODO DE ANÁLISE MOLECULAR

	Vantagens	Desvantagens
Seqüenciamento	<ul style="list-style-type: none"> ● Alta resolução específica, para as spp. de seqüências completas ou parciais da região ITS do rDNA ● Confiabilidade e alinhamento pelo aplicador, manejo e concerto dos erros de leitura; 	<ul style="list-style-type: none"> ● Difícil interpretação, demanda tempo para analisar os dados das combinações das bases; ● Processo minucioso e demorado ● Custo alto, uma média de U\$30,00 por amostra; ● Demanda um equipamento caro e softwares específico
PCR-RFLP com enzimas	<ul style="list-style-type: none"> ● Fácil interpretação, sem muitos processos; ● Processo rápido; ● Médio custo, na faixa de U\$ 19,00 por amostra; ● Com menos protocolos de aplicação, resultando numa menor chance de contaminação das amostras; 	<ul style="list-style-type: none"> ● Baixa amplitude específica, ou seja, pouca distinções inter-específicas de espécies incomuns para o local ● Não identifica espécies novas, somente identifica as espécies pré-selecionados;

5. CONCLUSÕES

As diferenças morfológicas do gênero *Ulva* apresentadas nesse estudo confirmaram novamente os resultados dos inúmeros estudos já realizados nessa área. A distinção por combinações de características morfológicas e citológicas é de extrema dificuldade e imprecisão.

A importância do monitoramento de espécies de *Ulva*, principalmente em áreas estuarinas habitadas, propícias para a eutrofização devido ao alto aporte de nutrientes, torna-se uma ferramenta para o entendimento do fenômeno das marés verdes ou o invasão de uniespecífica, que em alguns casos, são causadas por espécies Ulvoideas exóticas.

As metodologias de menor custo tanto para a extração de DNA vegetal como para identificação molecular de espécies de *Ulva* utilizando a metodologia PCR-RFLP com enzimas de restrição, apresentaram como sendo uma ferramenta convidativa para projetos de menor custo e curto prazo. Assim sendo mais uma opção de identificação inter-específica molecular de *Ulva* dentre as demais utilizadas atualmente. Porém, demonstra algumas limitações, sendo recomendável o uso com cautela para melhor interpretação dos dados obtidos através da metodologia PCR-RFLP com enzimas de restrição..

6. REFERÊNCIAS

BERMAN, J. & CARLTON, J. T. (1991). Marine invasion processes: Interaction between native and introduced snails. *In: J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 150: 267-281.

BLIDING, C. (1963). A critical survey of European tava in Ulvales. II. Ulva. Ulvaria, Monostroma, Kornmannia. **Bot. Not.** 121: 535-629

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. (1978). **Introduction to the Algae Prentice-Hall biological science series.** USA : 706 p

BLOMSTER, J.; MAGGS, C. A. & STANHOPE, M. J. (1998). MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF *ENTEROMORPHA INTESTINALIS* AND *E. COMPRESSA* (CHLOROPHYTA) IN THE BRITISH ISLES *In: J. Phycol.* 34: 319-340

BLOMSTER, J. ; BÄCK, S. ; FEWER, D. P. ; KIIRIKKI, M. ; LEHVO, A. ; MAGGS, C. A. ; & STANHOPE, M. J. (2002). Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides. *In : Amer. J. Bot.* 89 : 1756-1763.

COAT, G., DION, P., NOAILLES M.-C., REVIERS B., FONTAINE, J.-M., BERGER-PERROT, Y., LOISEAUX-DE GOËR, S. B. (1998). *Ulva armoricana* (Uvales, Chlorophyta) from the coasts of Brittany (France). II. Nuclear rDNA ITS sequence analysis. *In : Eur. J. Phycol.* 33 : 81-86.

DION, P., REVIERS, B de, COAT, G. (1998). *Ulva armoricana* sp. nov. (Ulvales, Chlorophyta) from the coasts of Brittany (France). I. Morphological identification *In* : **Eur. J. Phycol.** 33 : 73-80.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *In*: **Focus.** 12:13-15

FLETCHER, R. T. (1996). The occurrence of 'green tide'. *In* : **Schramm, W. and Nienhuis, P.H. (Eds) Marine Benthic Vegetation – Recent Changes and the Effects of Eutrophication.** Springer Verlag, Berlin, p 7-43.

HANYUDA T., SHIMADA S., SUZUKI T., GAMAGORI CITY OFFICE, NAKAMURA K., BOO S. M., and KAWAI H. (2006). **Species diversity and biogeography of introduced *Uva* species in Japan.** NaGISA International Conference, 2006, Kobe international Congress Center, Kobe, Japan, 16-18 October 2006.

HAYDEN, H.S. & WAALAND, R., (2002). Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences *In*: **J. Phycol.** 38: 1200-1212

HAYDEN, H.S., BLOMSTER, J., MAGGS, C.A., SILVA, P. C., STANHOPE, M. J. WAALAND, R. (2003). Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *In* **Eur. J. Phycol.** 38 : 277-294

HAYDEN, H.S., WAALAND, R. (2004). A molecular systematic study of *Ulva* (Ulvaceae, Ulvales) from the northeast Pacific. *In*: **Phycologia.** 43: 364-382

HIRAOKA, M.; SHIMADA S.; UENOSONO, M. & MASUDA, M. (2004). A new green-tide-forming alga, *Ulva Ohnoi* Hiraoka at Shimada sp. nov, (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. *In* : **Phycol. Res.** 52 : 19-27.

HOLLAND, B. S. (2000). Genetics of marine bioinvasion, *In*: **Hydrobiologia** 420 : 63-71

IIMA, M. & FUKUSUMI, K. (1996). First report of *Chloropelta caespitosa* (Ulvaceae, Ulvales, Ulvophyceae) in Japan. *In*: **Phycol. Res.** 44: 167-171

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. (2005). *Biologia Celular e Molecular*. Editora GUANABARA KOOGAN S.A. p332

KREUZER, H. & MASSEY, A. (2002). **Engenharia Genética e Biotecnologia**. Editora ArtMed. São Paulo, SP. p 435

KAWAI, H. (2001). **Seaweeds of Kobe**. Editora Athletic federation of Kobe city. Japan. p146 Em japonês.

KAWAI, H.; UWAI, S.; HANYUDA, T.; YAMADA, M. & NAKAMURA, K. (2007). Intercontinental introductions of marine macroalgae. Analyses of origins spread pathways of introduced populations using molecular markers. *In*: **Aquabiology**. 29: 212-220. Em japonês.

KUDO, T. & NOTOYA, M. (1999). The free-floating *Ulva* species growing in the calm seas. Case of the Sea Park of Yohama City. *In*: **Notoya, M.(Ed.) Use of *Ulva* and Restoration of the Environment**. Seizando, Tokyo. 55-70 Em japonês

LOBBAN, C. S. & HARRISON, P. J. (2000). **Seaweed Ecology and Physiology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p 366

MALTA, E-J, DRAISMA & G. A. S., KAMERMANS, P. (1999). Free-floating *Ulva* in the southwest Netherlands: speceis or morphotypes? A morphological, molecular and ecological comparison . *In* : **Eur. J. Phycol.** 34: 443-454.

NAKAMURA, K.; HANYUDA, T., USHIHARA, Y. & KAWAI, H. (2007). Genetic identification of *Ulva* species in Osaka Bay. The 31th Annual Meeting of the Japanese Society of Phycology, Kobe, Hyogo.

OHNO, M. (1993). Cultivation of the Green algae, *Monostroma* and *Enteromorpha* "Aonori". In OHNO, M. ^ CRITCHLEY, A. T. (eds). **Seaweed cultivation and marine Ranching**.. Yokosuka, Japan, pp.7-15.

PASSAMONTI, J. PEG purification Mensagem recebida por : <passamonti@hotmail.com>, em 0808/2006

PROVASOLI, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: WATANABE, A. & HATTORI, A. (Eds). **Cultures and Collections of Algae**. Proc. U. S.- Japan Conf., September 1966. Jpn. Soc. Plant. Phtsiol., Tokyo, pp. 66-73

RAJENDRAM, N.; MATSUDA, O.; URUSHIGAWA, Y. & SIMIDU, U. (1994). Characterization of Microbial Community Structure in the Surface Sedimento f Osaka Bay, by Phospholipid Fatty Acid Analysis. *In*: **Appl. Env. Microbiol.** 60: 248-257.

SHIMADA, S.; HIRAOKA, M.; NABATA, S.; IIMA M. & MASUDA M. (2003). Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae) with special reference to the free-floating *Ulva* In: **Phycol. Res.** Japan : 51: 99-108

SILVA, J. S. V. & SOUZA, R. C. C. L. (2004). **Água de Lastro e Bioinvasão.** Interciência. Engenho novo, RJ. p224

TAN, I. H., BLOMSTER, J., HANSEN, G., LESKINEM, E., MAGGS, C.A., MANN, D.G., SLUIMAN, H. J., STANHOPE, M.J. (1999). Molecular Phylogenetic Evidence for a Reversible Morphogenetic Switch Controlling the Gross Morphology of Two Common Genera of Green Seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha*. In: **Mol. Bio. Evol** : 16: 1011-1018

TANNER, C. E. (1979). **The Taxonomy of Morphological Variation of distromatic ulvaceous algae (Chlorophyta) from the Northeast Pacific.** Unpublished PhD dissertation, University of British Columbia, Vancouver. p 249

TANNER, C. E. (1986). Investigations of the taxonomy and morphological variation of *Ulva* (Chlorophyta): *Ulva californica* Wille In: **Phycologia** : 25: 510-520.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B. & TAYLOR, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications** (INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SMINSKY, J. J. & WHITE, T. J., editores) 423-453. Academic Press, San Diego, CA.

YUASA, I.; HASHIMOTO, E. & UEASHIMA, H. (1993). **Nitrogen and Phosphorus Distribution across the Thermohaline Front in Kii Channel in Winter.** In: J. Oceanogr. 49: 407-424

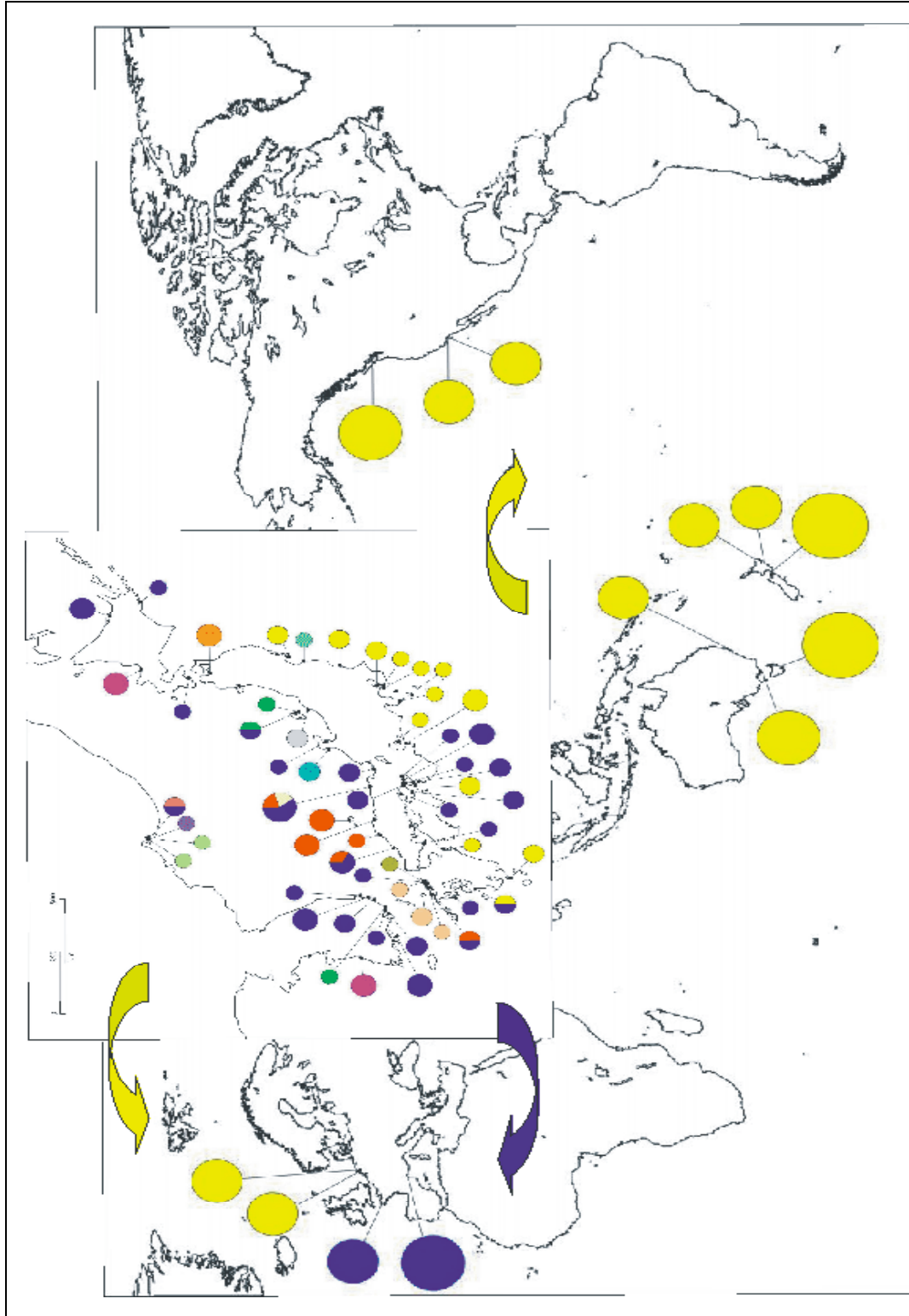
Web sites consultados:

ALGAE BASE (2008). Disponível em: www.algabase.org. Acessado em 10 de abril de 2008

NCBI (2008). Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov . Acessado em 3 de maio de 2008

ANEXO

ANEXO 1



ANEXO 1 - Mapa mostra haplotipos japoneses de *Uva pertusa* que se espalharam pelo mundo através da ação antrópica. Os círculos amarelos são haplotipos provenientes da costa do pacífico. Os círculos azuis são haplotipos de *Uva pertusa* de origem