

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**DARLENE LOPES RANGEL**

**GENÔMICA COMPARATIVA DE ALGAS DA CLASSE TREBOUXIOPHYCEAE**

**São Gabriel  
2015**

**DARLENE LOPES RANGEL**

**GENÔMICA COMPARATIVA DE ALGAS DA CLASSE TREBOUXIOPHYCEAE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Paulo Marcos Pinto

**São Gabriel  
2015**

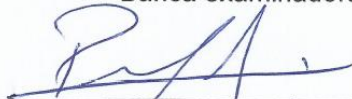
**DARLENE LOPES RANGEL**

**GENÔMICA COMPARATIVA DE ALGAS DA CLASSE TREBOUXIOPHYCEAE**

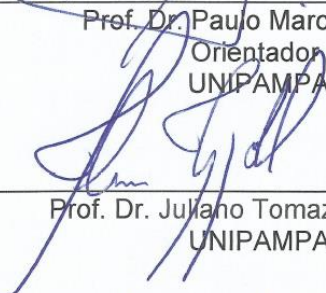
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 21 de maio de 2015.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto  
Orientador  
UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
UNIPAMPA



M. Sc. Evelise Leis Carvalho  
UNIPAMPA

## **AGRADECIMENTO**

Aos meus pais, por me apoiarem e incentivarem durante todos esses anos, independente do que acontecesse.

Ao professor Paulo, por ter me dito que eu estava desperdiçando minha inteligência e por ter insistido pra que eu viesse para o LPA.

A todo o grupo do LPA, por toda a parceria e momentos bons e ruins, principalmente as gurias do “megazorde” por sempre me apoiarem e nunca me deixarem sozinha.

Ao Pablo, por todo carinho, compreensão e paciência.

Aos meus colegas da turma quinze, que trilharam esse caminho comigo e aos professores que sempre nos instruíram da melhor maneira possível.

“São nossas escolhas, mais do que nossas capacidades, que mostram quem realmente somos”.

J.K. Rowling

## RESUMO

A classe Trebouxiophyceae é um grupo de algas morfológicamente heterogêneo que habitam principalmente o solo e águas doces. Estas algas estão presentes, também, no continente Antártico, que é o quinto maior continente em extensão, com aproximadamente 13,7 milhões de km<sup>2</sup>. É um continente extremo, sendo o mais alto, mais frio, mais seco e com os ventos mais fortes. Em adição a estas condições climáticas extremas, as radiações UVA e UVB são aspectos que afetam a estrutura e desenvolvimento de plantas. A espécie mais comumente relatada é *Prasiola crispera* (Lightfoot) Kützing. Esta alga normalmente cresce em solos úmidos que são fertilizados pelo guano do pássaro, dentro e adjacente às colônias de pinguins. Tolerar repetidos ciclos de congelamento/descongelamento na primavera e no outono, o congelamento durante o inverno e altos níveis de radiação UV durante o verão. Os organismos presentes na vegetação Antártica, por apresentarem características tão peculiares, se tornam um bom alvo para o estudo de suas organelas acessórias. A exploração do genoma de organelas acessórias revelou uma surpreendente arquitetura genômica. Alguns dos mais diversos e incomuns DNA de mitocôndria e cloroplasto vem de algas verdes. Apesar de numerosas funções biológicas de ambas organelas, elas dependem consideravelmente de proteínas codificadas e importadas do núcleo. A compreensão do genoma de organelas acessórias dará um forte impacto nos domínios da evolução, biologia e biotecnologia. Com base na literatura referente a *P. crispera* e podendo o genoma de organelas fornecer informações tão importantes, nosso grupo sequenciou os genomas mitocondrial e plastidial da alga antártica *P. crispera*. O DNA das organelas foi sequenciado pelo serviço Macrogen em um aparelho de sequenciamento de nova geração Solexa-Illumina Hi Seq 2500, de acordo com as instruções do fabricante. A montagem da sequência foi realizada com o software SOAPdenovo2. Todas as ORFs foram anotadas utilizando CpGAVAS e Mitofy, para cloroplasto e mitocôndria, respectivamente. A partir de dados obtidos do NCBI, referentes a espécies de algas Trebouxiophyceae com mtDNA e cpDNA sequenciados, estes dados foram comparados com os dados de *P. crispera* em relação a tamanho em pares de base, número de CDS, conteúdo G+C, tRNA, rRNA, assim como ausência e presença de genes relacionados a produção de energia e estresse oxidativo. Com base em nossos resultados, observa-se que *P. crispera* apresenta os genomas mitocondrial e

plastidial grandes, porém em relação ao número de genes, a espécie fica entre as espécies de Trebouxiophyceae com menores conteúdos gênicos. *P. crisper* também não apresenta vários genes relacionados ao fotossistema I e II e à síntese de ATP no cloroplasto, funções estas importantes para o metabolismo de energia da planta. Na mitocôndria, vários genes relacionados ao complexo oxidativo e a síntese de ATP estão ausentes, sendo essas funções cruciais para a sobrevivência do organismo. Uma hipótese possível é que esses genes tenham sido incorporados pelo genoma nuclear durante a evolução da planta. Estudos futuros, como, por exemplo, o sequenciamento do genoma nuclear de *P. crisper* poderão elucidar questões como esta.

Palavras-Chave: *Prasiola crisper*, genoma mitocondrial, genoma plastidial, Trebouxiophyceae.

## ABSTRACT

The Trebouxiophyceae class is a group of morphologically heterogeneous algae mainly inhabit the soil and freshwater. These algae are present also in the Antarctic continent, which is the fifth largest continent in size, with approximately 13.7 million km<sup>2</sup>. It is a continent of extremes, being the highest, coldest, driest and with the strongest winds. In addition to these extreme weather conditions, UVA and UVB radiation are aspects that affect the structure and development of plants. The most commonly reported species is *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing. This algae usually grows in moist soils that are fertilized by the guano bird, within and adjacent to colonies of penguins. It tolerates repeated freeze/thaw cycles in the spring and fall, freezing during the winter, and high UV radiation levels during the summer. The organisms in the Antarctic vegetation, because of their peculiar characteristics, become a good target to study its accessory organelles. The exploration of the genome of accessory organelles revealed a surprising genomic architecture. Some of the most varied and unusual mitochondria and chloroplast DNA comes from green algae. Despite numerous biological functions of both organelles, they rely heavily on imported and encoded proteins from the nucleus. Understanding the genome of accessory organelles represents a strong impact in the fields of evolution, biology and biotechnology. Based on the current literature on *P. crispa* and how the genome of organelles provide such important information, our group sequenced the mitochondrial and plastid genomes from the Antarctic algae *P. crispa*. Organelle DNA was sequenced by the Macrogen DNA Sequencing Service in a Solexa-IlluminaHiSeq 2500 New Generation Sequencing (NGS) device according to the manufacturer's instructions. Sequence assembly was performed with SOAPdenovo2 software v2.01. All ORFs were annotated using CpGAVAS and Mitofy for chloroplast and mitochondrial genomes respectively. The data obtained from the NCBI relating to species of Trebouxiophyceae algae with mtDNA and cpDNA sequenced were compared with the data of *P. crispa* relative to base pair size, number of CDS, G+C content, tRNA, rRNA, as well as absence and presence of genes related to energy production and oxidative stress. Based on our results, it was observed that *P. crispa* possesses one of the largest mitochondrial and plastid genome, but in relation to the number of genes between the Trebouxiophyceae species. *P. crispa* has the smallest gene content, it does not contain several genes related to the photosystem I and II



and the synthesis of ATP in the chloroplast and these are related to important functions of the plant for energy metabolism. Various genes related to mitochondrial oxidative complex and ATP synthesis are absent, and these are critical functions for the organism survival. One possible explanation is that these genes have been incorporated into the nuclear genome of the plant during its development. Future studies, such as the sequencing of *P. crispera* nuclear genome may elucidate issues like this.

Keywords: *Prasiola crispera*, mitochondrial genome, plastid genome, Trebouxiophyceae

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – *Prasiola crispa*: abundante em locais com presença de aves marinhas...14
- Figura 2 – Estrutura quadripartida do cromossomo plastidial.....18

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre o cpDNA de <i>Prasiola crispera</i> com algas Trebouxiophyceae.....	23
Tabela 2 – Comparação entre o conteúdo gênico de <i>Prasiola crispera</i> e algas Trebouxiophyceae em relação ao fotossistema I .....	25
Tabela 3 – Comparação entre o conteúdo gênico de <i>Prasiola crispera</i> e algas Trebouxiophyceae em relação ao síntese de ATP .....	26
Tabela 4 – Comparação entre o conteúdo gênico de <i>Prasiola crispera</i> e algas Trebouxiophyceae em relação ao fotossistema II .....	27
Tabela 5 – Comparação entre o mtDNA de <i>Prasiola crispera</i> com algas Trebouxiophyceae .....	30
Tabela 6 – Comparação entre o conteúdo gênico de <i>Prasiola crispera</i> e algas Trebouxiophyceae em relação a síntese de ATP, complexo respiratório I, II, III e IV. ....	31

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

mtDNA – DNA mitocondrial

cpDNA – DNA plastidial

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ATP – Adenosina trifosfato

CDS – Coding Sequence

tRNA – RNA transportador

rRNA – RNA ribossômico

Conteúdo G+C – Conteúdo de guanina e citosina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta e armazenamento da planta</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Isolamento do DNA</b> .....	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b>Sequenciamento, montagem e anotação</b> .....	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>Comparação entre o genoma plastidial de <i>Prasiola cripa</i> e algas Trebouxiophyceae</b> .....	<b>21</b>
<b>4.5</b>	<b>Comparação entre o genoma mitocondrial de <i>Prasiola cripa</i> e algas Trebouxiophyceae</b> .....	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>Genoma plastidial de <i>Prasiola cripa</i> e comparação com algas Trebouxiophyceae</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2</b>	<b>Genoma mitocondrial de <i>Prasiola cripa</i> e comparação com algas Trebouxiophyceae</b> .....	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>38</b>



## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

As algas verdes representam uma antiga linhagem de eucariotos fotossintéticos. Estima-se sua origem entre 700 e 1500 milhões de anos. Esta linhagem (Viridiplantae) dividiu-se muito cedo em duas divisões principais: Chlorophyta, que contém a maioria das algas verdes descritas, e Streptophyta contendo as algas verdes Charophyta e seus descendentes de plantas terrestres (LEMIEUX; OTIS; TURMEL, 2014).

A divisão Chlorophyta constitui um grupo morfológicamente e ecologicamente diversificado de algas verdes. Esta grande linhagem inclui todas as plantas terrestres e algas verdes. A maioria das clorofíceas foram divididas em quatro classes (Prasinophyceae, Ulvophyceae, Trebouxiophyceae e Chlorophyceae) com base na ultra-estrutura do aparelho flagelar e na citocinese durante a mitose (TURMEL; OTIS; LEMIEUX, 2009).

A classe Trebouxiophyceae é um grupo de algas morfológicamente heterogêneo que habitam principalmente o solo e águas doces. A maioria dos líquens ficobiontes e animais ciliados estão incluídos nessa classe (BOCK; KNOOP, 2012), que também compreende espécies que perderam a capacidade fotossintética e evoluíram de vida livre para estilos de vida parasitário heterotrófico (por exemplo, *Prototheca wickerhamii* e *Helicosporidium* sp.). Além de seu interesse biológico intrínseco, algas Trebouxiophyceae tem atraído a atenção da comunidade científica devido a sua potencial utilidade em uma variedade de aplicações biotecnológicas, como a produção de biocombustível e outras moléculas de alto valor econômico (LEMIEUX; OTIS; TURMEL, 2014).

Dentre a classe Trebouxiophyceae, está a ordem Prasiolales, que é uma ordem de algas verdes marinhas, de água doce ou terrestres, difundidas em regiões de baixas temperaturas e polares são caracterizadas por um cloroplasto axial estrelado, com um pirenoide central, células flageladas com quatro raízes microtubulares em um arranjo cruzado e um corpo basal com rotação anti-horária. Apesar de relativamente simples, a morfologia das Prasiolales é muito diversificada e inclui filamentos unisseriados, fitas estreitas, lâminas expandidas e colônias carcinoides (RINDI; MCIVOR; GUIRY, 2004).

Algas verdes Trebouxiophyceae do gênero *Prasiola*, pertencentes à ordem Prasiolales, estão entre as algas Antárticas mais conhecidas e em muitos locais terrestres e supralitorais representam os produtores primários mais importantes (MONIZ et al., 2012). *Prasiola* Meneghini 1838 é o gênero com maior número de espécies entre Prasiolales. Atualmente, inclui 26 espécies distribuídas em ambientes marinhos, de água doce e habitats terrestres de regiões de clima frio. Estas plantas são mais abundantes e melhor observáveis em locais sujeitos a entrada de nitrogênio orgânico. O gênero foi estabelecido por Meneghini em 1838 para um grupo de algas anteriormente considerada uma tribo do então amplamente descrito *Ulva* (RINDI, 2010).

A espécie mais comumente relatada é *Prasiola crista* (Lightfoot) Kützing. Esta alga normalmente cresce em solos úmidos que são fertilizados pelo guano do pássaro, por exemplo, dentro e adjacente às colônias de pinguins. Tolerância repetidos ciclos de congelamento/descongelamento na primavera e no outono, o congelamento durante o inverno, e altos níveis de radiação UV durante o verão. Estudos detalhados sobre a taxonomia de representantes *Prasiola* da Antártida são praticamente inexistentes na literatura recente. *P. crista* foi primeiramente descrita por Lightfoot (1777) como *Ulva crista* com base no material da Ilha de Skye, na Escócia, mas desde então tem sido relatada como cosmopolita em locais frios-temperadas e polares, incluindo todas as três zonas da Antártica (MONIZ et al., 2012).

Figura 1 - *Prasiola crista*, abundante em locais com presença de aves marinhas.



Fonte: <http://www.oceanites.org>



Recentemente, *P. crisper* foi relatada como tóxica para mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) e baratas (*Nauphoeta cinereae*), apresentando-se com um potencial uso biotecnológico para inseticidas (ZEMOLIN et al., 2014)

O continente Antártico é o quinto maior continente em extensão, com aproximadamente 13,7 milhões de km<sup>2</sup>. É um continente extremo, sendo o mais alto, mais frio, mais seco e com os ventos mais fortes. Em adição a estas condições climáticas extremas, as radiações UVA e UVB são aspectos que afetam a estrutura e desenvolvimento de plantas (PUTZKE et al., 2015). Três zonas biogeográficas são reconhecidos na Antártida e regiões vizinhas: sub-Antártica, Antártica marítima e Antártica continental. Os ecossistemas terrestres e características climáticas dessas três zonas são muito diferentes. A zona continental Antártica é submetida a condições severas e temperaturas mais extremas, e é caracterizada pela diversidade de espécies menores que as outras duas zonas (MONIZ et al., 2012).

Apesar do clima severo, muitos organismos fotossintéticos ainda vivem em habitats terrestres limitados do continente antártico. Temperatura, umidade e mudanças na intensidade de luz são muito drásticas sazonalmente e até mesmo dentro de um dia (KOSUGI et al., 2010). Na Antártica continental, são observadas várias relações específicas com a exposição de tipos de solo, geomorfologia e abastecimento de água, de modo que há uma relação positiva entre a flora da Antártica e colônias de aves, onde os nutrientes são obtidos diretamente a partir de fontes animais. Apenas algumas plantas podem sobreviver na Antártica e proporcionam uma distribuição geográfica diretamente relacionada a fatores abióticos (PUTZKE et al., 2015). Estes organismos presentes na vegetação Antártica, por apresentarem características tão peculiares, se tornam um bom alvo para o estudo de suas organelas acessórias.

A exploração do genoma de organelas acessórias (moléculas de DNA encontradas dentro de mitocôndrias e cloroplastos) revelou uma surpreendente arquitetura genômica. Alguns dos mais diversos e incomuns DNA de mitocôndria e cloroplasto vem de algas verdes. De fato, entre os grupos de algas verdes há uma impressionante gama de tamanhos de genoma de organelas, conformações (circular ou linear), números de cromossomos (monomérica, bipartidos, ou altamente fragmentado), compactação (DNA que codifica 20-95%), repertórios gênicos e composições de nucleotídeos. Estudos de genomas de organelas acessórias de algas têm ajudado a desvendar as origens e as interações de plantas e eucariotas

como um todo, desde conhecimentos sobre a evolução do genoma, e contribuiu para mudar o equívoco que genomas de organelas são relativamente homogêneos em termos de estrutura e conteúdo (LELIAERT et al., 2012).

A mitocôndria originou-se cerca de 1,5 milhões de anos atrás, provavelmente através do englobamento de uma  $\alpha$ -proteobactéria endossimbionte (GRAY; BURGER; LANG, 1999). Durante a evolução que levou à mitocôndria funcional, a maioria do seu conteúdo gênico foi transferido para o núcleo da célula hospedeira. Atualmente, as mitocôndrias de plantas mantêm uma pequena porção de seu genoma ancestral, que agora só codifica para um conjunto parcial dos componentes de suas membranas de transdução de energia e componentes essenciais para a expressão da sua maquinaria de genes (HAMMANI; GIEGÉ, 2014). Em grande parte, as proteínas específicas do DNA mitocondrial (mtDNA) são componentes do complexo respiratório I (NADH: ubiquinona oxidoreductase, codificadas por genes NAD), II (succinato: ubiquinona oxidoreductase; SDH), III (ubiquinona: citocromo c oxidoreductase; COB) e IV (citocromo c oxidase; cox) da cadeia de transporte de elétrons (GRAY; BURGER; LANG, 1999).

As mitocôndrias são onipresentes em células eucarióticas e executam uma ampla gama de funções celulares essenciais (PALMIERI et al., 2011), são consideradas as “casas de força” da célula que fornecem a energia necessária para as atividades celulares (HAMMANI; GIEGÉ, 2014). Contudo, em plantas, também estão envolvidas em outras tarefas metabólicas, incluindo assimilação de nitrogênio, fotorrespiração, metabolismo C<sub>1</sub>, fotossíntese em plantas C<sub>4</sub>, metabolismo de crassuláceas e armazenamento de carbono e nitrogênio durante a germinação de sementes (PALMIERI et al., 2011).

Os cloroplastos, assim como as mitocôndrias, originaram-se de um evento de endossimbiose a partir de uma cianobactéria ancestral, que foi englobado por um eucarioto no qual mitocôndrias já haviam sido estabelecidas (SAKAMOTO; MIYAGISHIMA; JARVIS, 2008). Durante a evolução, o genoma derivado de cianobactéria sofreu uma redução dramática no tamanho, principalmente como resultado da perda de gene imediata e a transferência de larga escala de genes para o genoma nuclear. Assim, os genomas de cloroplastos (cpDNA) modernos podem conter apenas 120-130 genes, muitos dos quais codificam para a maquinaria de expressão gênica da organela e seu aparato fotossintético, e estão organizados em nucleóides que misturam características de procariotos e

eucariotos. No entanto, os cloroplastos contêm muitas de proteína do que o seu genoma pode codificar, assim, a maioria das proteínas do cloroplastos são agora codificadas pelo genoma nuclear e devem ser importadas pós-tradução para a organela (JARVIS; LÓPEZ-JUEZ, 2013).

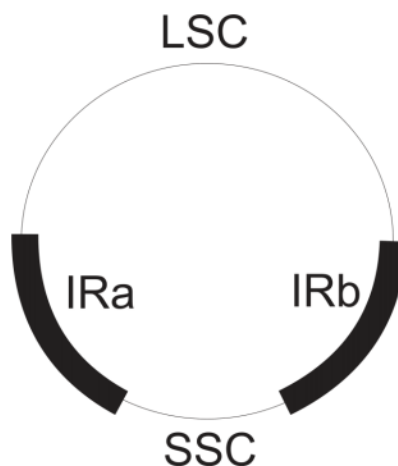
Plastídios formam um grupo distinto de organelas em plantas superiores e inferiores e são uma das características pela qual as plantas se diferem dos animais. Durante muitos anos, a maioria da investigação com base em plastídeos é focada no cloroplasto e tenta compreender o mecanismo de fotossíntese e as interações bioquímicas do cloroplasto com a célula (BOCK, 2007).

A formação de cloroplastos é iniciada a partir de proplastídeos, um tipo de plasto indiferenciado que está presente no meristema apical. Respondendo à luz, os proplastídeos desenvolvem a grana, que são pilhas de tilacóides, onde a maquinaria de captação de luz, a transferência de elétrons e a síntese de ATP são formados (SAKAMOTO; MIYAGISHIMA; JARVIS, 2008). Os cloroplastos contêm o pigmento verde clorofila e são responsáveis pelas reações de luz, alimentando a fotossíntese, em que essencialmente toda a vida depende (JARVIS; LÓPEZ-JUEZ, 2013). Além da fotossíntese, os cloroplastos são capazes de realizar muitas outras funções especializadas que são essenciais para o crescimento da planta e seu desenvolvimento – assimilação de nitrato e sulfato, síntese de aminoácidos, clorofila e carotenóides. Para realizar essas tarefas, os seus sistemas de membrana estão equipados com funções de transporte especializados. As membranas do invólucro exterior e interior medeiam a importação e triagem de proteínas e troca de metabólitos, enquanto complexos de proteínas nas membranas tilacóides implementam os processos de prótons e de transporte de elétrons, que são uma parte essencial das reações fotossintéticas. Além disso, os plastídios comunicam-se com o núcleo por sinalização retrógrada para ajustar a expressão de genes nucleares de acordo com o estado metabólico e de desenvolvimento da organela (JENSEN; LEISTER, 2014).

O cpDNA é o mais exaustivamente estudado, devido a sua estrutura molecular original e a sua herança uniparental, o cpDNA tem muitas propriedades excelentes para análises evolutiva, este é notavelmente conservado na sua estrutura molecular e funcional entre todas as plantas verdes. A maioria dos cloroplastos de plantas terrestres e algas possui um genoma quadripartido, composto por uma grande região de cópia gênica única (LSC) e uma pequena região gênica única

(SSC), que consiste de numerosos genes funcionais chave, separadas por duas cópias de regiões repetidas invertidas (IRA e IRB) (KUA et al., 2012; LI et al., 2013)

Figura 2 - Estrutura quadripartida do cromossomo plastidial.



Fonte: MOTTA, 2007

Apesar de numerosas funções biológicas de ambas organelas, elas dependem consideravelmente de proteínas codificadas e importadas do núcleo. A compreensão do genoma de organelas acessórias dará um forte impacto nos domínios da evolução, biologia e biotecnologia (JEONG et al., 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

Com base na atual literatura referente a *P. crispa* e podendo o genoma de organelas fornecerem informações tão importantes, nosso grupo sequenciou os genomas mitocondrial e plastidial da alga antártica *P. crispa*.

### 3. OBJETIVO

Este trabalho objetivou sequenciar os genomas mitocondrial e plastidial de *P. crispera* e comparar suas características com genomas de algas da classe Trebouxiophyceae.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar o genoma mitocondrial de *P. crispera*;
- Sequenciar o genoma plastidial de *P. crispera*;
- Comparar as informações obtidas com o mtDNA de *P. crispera* com informações de mtDNA de algas Trebouxiophyceae;
- Comparar as informações obtidas com o cpDNA de *P. crispera* com informações de cpDNA de algas Trebouxiophyceae.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DA PLANTA**

Os exemplares de *P. crispera* foram coletados em áreas de degelo da Ilha de HalfMoon e da Ilha de Rei George, Antártica. A planta foi armazenada a -20°C até o momento da extração do DNA.

### **4.2 ISOLAMENTO DO DNA**

O DNA foi extraído utilizando-se o mini kit DNEasy (QIAGEN, Valencia, CA), segundo as recomendações do fabricante.

### **4.3 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO**

O DNA das organelas foi sequenciado pelo serviço Macrogen em um aparelho de sequenciamento de nova geração Solexa-Illumina Hi Seq 2500 de acordo com as instruções do fabricante. A montagem da sequência foi realizada com o software SOAPdenovo2. Todas as ORFs foram anotadas utilizando CpGAVAS e Mitofy, para cloroplasto e mitocôndria, respectivamente.

### **4.4 COMPARAÇÃO ENTRE O GENOMA PLASTIDIAL DE *P.crispa* E ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE**

Os dados foram obtidos a partir do National Center for Biotechnology Information (NCBI), referentes a 29 espécies de algas Trebouxiophyceae com cpDNA sequenciado (Tabela 1), estes dados foram comparados com *P. crispera* em relação a tamanho em pares de base (pb), número de CDS, conteúdo G+C, tRNA, rRNA, assim como ausência e presença de genes relacionados a síntese de ATP, bem como fotossistema I e fotossistema II.

#### **4.5 COMPARAÇÃO ENTRE O GENOMA MITOCONDRIAL DE *P.crispa* E ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE**

A partir de dados obtidos do NCBI, referentes a 8 espécies de algas Trebouxiophyceae com mtDNA sequenciado (Tabela 5), estes dados foram comparados com os dados de *P. crispera* em relação a tamanho em par de bases, número de CDS, conteúdo G+C, tRNA, rRNA, assim como ausência e presença de genes relacionados a síntese de ATP, bem como complexo respiratório I, complexo respiratório II, complexo respiratório III e complexo respiratório IV.



## 5. APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 5.1 GENOMA PLASTIDIAL DE *Prasiola crisper* E COMPARAÇÃO COM ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE

As informações do genoma plastidial de *P. crisper* (cpDNA) residem em uma única molécula com um comprimento total de 196.502 bp e um conteúdo G+C de 29,32%. O cpDNA contém um total de 32 genes putativos codificantes, 27 tRNAs, e 2 rRNAs. Entre estes, fomos capazes de anotar pelo menos 21 genes putativos codificantes de proteínas relacionadas à fotossíntese, como fotossistema I e II.

*P. crisper* possui quatro genes envolvidos na síntese de ATP, três genes envolvidos no fotossistema I e dez genes envolvidos no fotossistema II, o que é o menor conteúdo gênico envolvido nessas funções entre as Trebouxiophyceae, já que outras espécies possuem entre cinco e oito genes envolvidos na síntese de ATP, entre cinco e nove genes envolvidos no fotossistema I e entre dez e dezessete genes envolvidos no fotossistema II. A espécie *Helicosporidium sp.*, por ser uma alga parasita obrigatória de invertebrados, não apresenta nenhum gene relacionado a essas funções, esta espécie também apresenta seu cpDNA compactado, com um tamanho de apenas 37.454 pb (DE KONING; KEELING, 2006).

Entre o clado Prasiola, *P. crisper* contém um dos maiores cpDNA, com 196.502 pb (Tabela 1) (*Prasiolopsis sp.* com 306.1 kb, *Pabia signiensis* com 236.5 kb, *Koliella longiseta* com 197.1 kb, *Chlorella mirabilis* com 168.0 kb e *Stichococcus bacillaris* com 116.9 kb), já entre algas Trebouxiophyceae com cpDNA sequenciado as espécies com maior tamanho são *Dictyochloropsis reticulata* (289.394 pb), *P. signiensis* (236.5 pb) e *Neocystis brevis* (211.747 pb) (LEMIEUX; OTIS; TURMEL, 2014), (tabela 1). *P. crisper*, apesar de apresentar um dos maiores cpDNA entre as espécies do clado Prasiola, contém um dos menores conteúdo G+C entre a classe Trebouxiophyceae (29,32%) (*Dicloster acuatius* com 30,0%, *Lobosphaera incisa* com 27,8% e *Leptospira terrestris* com 27,3%) (DE CAMBIAIRE et al., 2007; LEMIEUX; OTIS; TURMEL, 2014).

Na comparação entre o cpDNA de *P. crisper* com algas da classe Trebouxiophyceae em relação à ausência e presença de genes, *P. crisper* não apresenta dois genes relacionados com a síntese de ATP, *atpE* e *atpF*, quatro espécies também não apresentam o gene *atpF*, *Chlorella sorokiniana*, *C. mirabilis*,

*N. brevis* e *P. signiensis*, já o gene *atpE* só se encontra ausente em *P. crispa* (Tabela 2). Em relação ao fotossistema I, cinco genes estão ausentes, *psaC*, *psaI*, *psaJ*, *psaM* e *ycf4*, o gene *psaC*, se encontra ausente somente em *P. crispa*. *C. sorokiniana* também não apresenta os genes *psaI* e *ycf4*, além disso, a espécie não apresenta o gene *yc3*, que está presente em *P. crispa* (tabela 3). *C. mirabilis* também não apresenta os genes *psaJ* e *psaM*, assim como *P. signiensis* não apresenta *psaI* e *psaM*, características compartilhadas com *P. crispa*. O gene *psaJ* ainda está ausente também em *Botryococcus braunii* e o gene *psaM* em *Neocystis brevis*. Quanto ao fotossistema II *P. crispa* não apresenta cinco genes, *psbB*, *psbF*, *psbI*, *psbK* e *psbZ* (Tabela 4). *N. brevis* e *P. signiensis* não apresentam os genes *psbI* e *psbZ*, assim como *Trebouxiophyceae sp.* não apresenta os genes *psbI* e *psbJ*. *Auxenochlorella protothecoides* e *C. sorokiniana*, ambas não apresentam o gene *psbK*, sendo essas ausências também encontradas em *P. crispa* (Tabela 4).



**Tabela 1 - COMPARAÇÃO ENTRE O cpDNA DE *Prasiola crisper* COM ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE.**

Espécie	Número de acesso	Tamanho (pb)	CDS	Nº de genes	rRNA	tRNA	Conteúdo G+C
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	NC_023775.1	84.576	78	111	2	31	63,5%
<i>Botryococcus braunii</i>	NC_025545.1	172.826	80	114	3	31	42,5%
<i>Chlorella sorokiniana</i>	NC_023835.1	109.811	75	109	3	31	
<i>Chlorella' mirabilis</i>	NC_025528.1	167.972	77	115	6	32	31,5%
<i>Chlorella variabilis</i>	KP271969.1	124.793	79	113	3	31	
<i>Chlorella vulgaris</i>	AB001684.1	150.613	174	115	3	33	
<i>Choricystis parasítica</i>	NC_025539.1	94.206	79	111	3	29	
<i>Coccomyxa sp.</i>	NC_015084.1	175.731	80	115	3	32	52,9%
<i>Dicloster acuatus</i>	NC_025546.1	169.201	87	128	6	33	30,0%
<i>Dictyochloropsis reticulata</i>	NC_025524.1	289.394	82	116	3	31	35,9%
<i>Elliptochloris bilobata</i>	NC_025548	134.677	82	115	3	30	45,8%
<i>Fusochloris perforata</i>	NC_025543.1	148.459	75	107	3	29	35,1%
<i>Helicosporidium sp. ex Simulium jonesii</i>	NC_008100.1	37.454	26	54	3	25	61,7%
<i>Koliella longiseta</i>	NC_025531.1	197.094	80	118	6	32	31,4%
<i>Leptospira terrestris</i>	NC_009681.1	195.081	88	119	3	28	27,3%
<i>Lobosphaera incisa</i>	NC_025533.1	156.031	78	111	3	30	27,8%
<i>Marvania geminata</i>	NC_025549.1	108.47	79	114	3	32	38,2%
<i>Microthamnion kuetzingianum</i>	NC_025537.1	158.609	75	107	3	29	34,7%
<i>Myrmecia israelenses</i>	NC_025525.1	146.596	78	112	3	31	30,4%
<i>Neocystis brevis</i>	NC_025535.1	211.747	84	117	3	30	31,4%
<i>Pabia signiensis</i>	NC_025529.1	236.463	80	118	6	32	33,4%
<i>Parachlorella kessleri</i>	NC_012978.1	123.994	84	126	6	36	30,0%
<i>Paradoxia multisetata</i>	NC_025540.1	183.394	90	125	3	32	50,6%

<i>Espécie</i>	Número de acesso	Tamanho (pb)	CDS	Nº de genes	rRNA	tRNA	Conteúdo G+C
	KR017748						
	KR017749						
<i>Prasiola crispera</i>	KR017750	196.502	32		2	27	29,32%
<i>Pseudochloris wilhelmii</i>	NC_025547.1	109.775	84	126	6	36	36,7%
<i>Stichococcus bacillaris</i>	NC_025527.1	116.952	85	115	3	27	31,9%
<i>Trebouxiophyceae sp. MX-AZ01</i>	NC_018569.1	149.707	80	115	3	32	57,7%
<i>Watanabea reniformis</i>	NC_025526.1	201.425	87	118	3	28	41,2%
<i>Xylochloris irregulares</i>	NC_025534.1	181.542	96	140	6	38	39,7%

**TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO GÊNICO DE PRASIOLA CRISPA E ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE EM RELAÇÃO AO SÍNTESE DE ATP**



Síntese de ATP	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	Sp 8	Sp 9	Sp 10	Sp 11	Sp 12	Sp 13	Sp 14	Sp 15	Sp 16	Sp 17	Sp 18	Sp 19	Sp 20	Sp 21	Sp 22	Sp 23	Sp 24	Sp 25	Sp 26	Sp 27	Sp 28	Sp 29	Sp 30
atpA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
atpB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	
atpE		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	
atpF		X	X			X	X	X	X	X	X	XX	X																	
atpH	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
atpI	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

 **Presença do gene**    **X = número de genes**  
 **Ausência do gene**

**Legenda:** Sp1 - *Prasiola crispa*; Sp2 - *Auxenochlorella protothecoides*; Sp3 - *Botryococcus braunii*; Sp4 - *Chlorella sorokiniana*; Sp5 - *Chlorella mirabilis*; Sp6 - *Chlorella variabilis*; Sp7 - *Chlorella vulgaris*; Sp8 - *Choricystis parasítica*; Sp9 - *Coccomyxa sp.*; Sp10 - *Dicloster acuatus*; Sp11 - *Dictyochloropsis reticulata*; Sp12 - *Elliptochloris bilobata*; Sp13 - *Fusochloris perforata*; Sp14 - *Helicosporidium sp.*; Sp15 - *Koliella longiseta*; Sp16 - *Leptosira terrestris*; Sp17 - *Lobosphaera incisa*; Sp18 - *Marvania geminata*; Sp19 - *Microthamnion kuetzingianum*; Sp20 - *Myrmecia israelenses*; Sp21 - *Neocystis brevis*; Sp22 - *Pabia signiensis*; Sp23 - *Parachlorella kessleri*; Sp24 - *Paradoxia multiseta*; Sp25 - *Planctonema lauterbornii*; Sp26 - *Pseudochloris wilhelmii*; Sp27 - *Stichococcus bacillaris*; Sp28 - *Trebouxiophyceae sp. MX-AZ01*; Sp29 - *Watanabea reniformis*; Sp30 - *Xylochloris irregulares*

**TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO GÊNICO DE PRASIOLA CRISPA E ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE EM RELAÇÃO AO FOTOSSISTEMA I**



	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	Sp 8	Sp 9	Sp 10	Sp 11	Sp 12	Sp 13	Sp 14	Sp 15	Sp 16	Sp 17	Sp 18	Sp 19	Sp 20	Sp 21	Sp 22	Sp 23	Sp 24	Sp 25	Sp 26	Sp 27	Sp 28	Sp 29	Sp 30
Fotossistema I																														
psaA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	XX	X	X	X	X	X	X	X	X
psaB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
psaC		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
psaI		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	XX	X	X	X
psaJ		X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
psaM		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
ycf3	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ycf4		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

 **Presença do gene**    **X = número de genes**  
 **Ausência do gene**

**Legenda:** Sp1 - *Prasiola crispa*; Sp2 - *Auxenochlorella protothecoides*; Sp3 - *Botryococcus braunii*; Sp4 - *Chlorella sorokiniana*; Sp5 - *Chlorella mirabilis*; Sp6 - *Chlorella variabilis*; Sp7 - *Chlorella vulgaris*; Sp8 - *Choricystis parasitica*; Sp9 - *Coccomyxa sp.*; Sp10 - *Dicloster acutus*; Sp11 - *Dictyochloropsis reticulata*; Sp12 - *Elliptochloris bilobata*; Sp13 - *Fusochloris perforata*; Sp14 - *Helicosporidium sp.*; Sp15 - *Koliella longiseta*; Sp16 - *Leptosira terrestris*; Sp17 - *Lobosphaera incisa*; Sp18 - *Marvania geminata*; Sp19 - *Microthamnion kuetzingianum*; Sp20 - *Myrmecia israelenses*; Sp21 - *Neocystis brevis*; Sp22 - *Pabia signiensis*; Sp23 - *Parachlorella kessleri*; Sp24 - *Paradoxia multisetata*; Sp25 - *Planctonema lauterbornii*; Sp26 - *Pseudochloris wilhelmii*; Sp27 - *Stichococcus bacillaris*; Sp28 - *Trebouxiophyceae sp. MX-AZ01*; Sp29 - *Watanabea reniformis*; Sp30 - *Xylochloris irregulares*

**TABELA 4. COMPARAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO GÊNICO DE PRASIOLA CRISPA E ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE EM  
RELAÇÃO AO FOTOSSISTEMA II**

	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	Sp 8	Sp 9	Sp 10	Sp 11	Sp 12	Sp 13	Sp 14	Sp 15	Sp 16	Sp 17	Sp 18	Sp 19	Sp 20	Sp 21	Sp 22	Sp 23	Sp 24	Sp 25	Sp 26	Sp 27	Sp 28	Sp 29	Sp 30	
Fotossistema II																															
psbA	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		XX	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	XX	X	X	X	X	X	
psbB	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbC	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbD	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbF		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbH	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbI		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X	X
psbJ		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	
psbK			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
psbM	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	XX	X	X	X	X	
psbN	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
psbT	X	XX	X	X		X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
psbZ		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	

 **Presença do gene**    **X = número de genes**  
 **Ausência do gene**

**Legenda:** Sp1 - *Prasiola crispa*; Sp2 - *Auxenochlorella protothecoides*; Sp3 - *Botryococcus braunii*; Sp4 - *Chlorella sorokiniana*; Sp5 - *Chlorella mirabilis*; Sp6 - *Chlorella variabilis*; Sp7 - *Chlorella vulgaris*; Sp8 - *Choricystis parasitica*; Sp9 - *Coccomyxa sp.*; Sp10 - *Diclostera acuatius*; Sp11 - *Dictyochloropsis reticulata*; Sp12 - *Elliptochloris bilobata*; Sp13 - *Fusochloris perforata*; Sp14 - *Helicosporidium sp.*; Sp15 - *Koliella longiseta*; Sp16 - *Leptosira terrestris*; Sp17 - *Lobosphaera incisa*; Sp18 - *Marvania geminata*; Sp19 - *Microthamnion kuetzingianum*; Sp20 - *Myrmecia israelenses*; Sp21 - *Neocystis brevis*; Sp22 - *Pabia signiensis*; Sp23 - *Parachlorella kessleri*; Sp24 - *Paradoxia multisetata*; Sp25 - *Planctonema lauterbornii*; Sp26 - *Pseudochloris wilhelmii*; Sp27 - *Stichococcus bacillaris*; Sp28 - *Trebouxiophyceae sp. MX-AZ01*; Sp29 - *Watanabea reniformis*; Sp30 - *Xylochloris irregula*

## 5.2 COMPARAÇÃO ENTRE O GENOMA MITOCONDRIAL DE *Prasiola crisper* E ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE

O DNA mitocondrial de *P. crisper* (mtDNA) possui um tamanho total de 89.819 bp e um conteúdo G+C de 29,29%. *P. crisper* possui o menor conteúdo gênico, apenas com 43 genes (*Coccomyxa sp.* com 60 genes, *Chlorella sorokiniana* com 61 genes e *Chlorella variabilis* com 62 genes) (Tabela 5), incluindo 18 genes putativos codificantes de proteínas, 22 tRNAs e 3 rRNA. Entre estes, foram anotados 18 genes putativos codificantes de proteínas relacionadas ao complexo respiratório I, III e IV.

*P. crisper* possui quatro genes envolvidos na síntese de ATP, seis genes envolvidos no complexo I, nenhum gene envolvido no complexo II, um gene envolvido no complexo III e um gene envolvido no complexo IV, o que é o menor conteúdo gênico referente a essas funções entre as Trebouxiophyceae (*Helicosporidium sp.*, *Chlorella sorokiniana*, *Auxenochlorella protothecoides*, *Chlorella variabilis*, *Coccomyxa sp. C-169*, todas possuem cinco genes envolvidos na síntese de ATP, nove genes envolvidos no complexo I, nenhum gene envolvido no complexo II, um gene envolvido no complexo III e três genes envolvidos no complexo IV) (POMBERT; KEELING, 2010, e informações obtidas a partir do NCBI)

Quando comparada a outras algas verdes Trebouxiophyceae com o genoma mitocondrial sequenciado, *P. crisper* apresenta o maior mtDNA entre as Trebouxiophyceae (*Chlorella variabilis* com 78.500 pb, *Trebouxiophyceae sp.* com 74.423 pb e *Coccomyxa sp.* com 65.497 pb).

Em uma comparação entre o mtDNA de *P. crisper* com algas da classe Trebouxiophyceae, *P. crisper* não apresenta um gene relacionado à síntese de ATP, *atp4* (Tabela 6) assim como em *Prototheca wickerhamii* (WOLFF et al., 1994). Em relação aos complexos respiratórios I, III e IV, *P. crisper* não apresenta quatro genes relacionados ao complexo I (*nad2*, *nad6*, *nad8* e *nad9*), com exceção do gene *nad8*, todos os genes ausentes em *P. crisper* estão presentes em todas as outras espécies Trebouxiophyceae. O gene *nad8* está ausente em todas as espécies Trebouxiophyceae com mtDNA sequenciado, porém é encontrado em espécies como *Reclinomonas americana* e *Andalucia godoyi*, pertencentes ao grupo Jakobida, um grupo de flagelados heterotróficos de vida livre (BURGER et al., 2013; LARA; CHATZINOTAS; SIMPSON, 2006). O gene *cob*, relacionado ao complexo



respiratório III está presente em todas as espécies Trebouxiophyceae com seu mtDNA sequenciado. Dois genes relacionados ao complexo IV, *cox2* e *cox3*, estão ausentes em *P. crista*, mas se apresentam em outras espécies, em algumas com várias cópias como em Trebouxiophyceae sp e *Chlorella* sp. onde esses genes se apresentam três vezes cada.



Em relação ao complexo II, nenhuma espécie Trebouxiophyceae apresenta genes relacionados a esse complexo respiratório, porém estes genes se apresentam na divisão Streptophyta, Rodophyta e no grupo Jakobida.

TABELA 5. COMPARAÇÃO ENTRE O mtDNA DE *Prasiola crisper* COM ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE.

Espécie	Número de acesso	Tamanho (pb)	CDS	Gene	rRNA	tRNA	Conteúdo G+C
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	NC_026009.1	57.274	39	70	3	26	63,5%
<i>Chlorella sorokiniana isolate 1230</i>	NC_024626.1	52.528	33	61	3	25	
<i>Chlorella variabilis isolate NC64A</i>	NC_025413.1	78.500	32	62	3	27	67,1%
<i>Coccomyxa sp. C-169</i>	NC_015316.1	65.497	31	60	3	26	52,9%
<i>Helicosporidium sp. ex Simulium jonesi</i>	NC_017841.1	49.343					61,7%
<i>Prasiola crisper</i>	KR017746 KR017747	89.819		43	3	22	29,29%
<i>Prototheca wickerhamii</i>	NC_001613.1	55.328	36	63	3	26	25,8%
<i>Trebouxiophyceae sp. MX-AZ01</i>	NC_018568.1	74.423	41	67	3	23	53,4%
<i>Chlorella sp. ArM0029B</i>	KF554428.1	65.049	35	65	3	27	

**TABELA 6. COMPARAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO GÊNICO DE *Prasiola crispa* E ALGAS TREBOUXIOPHYCEAE EM RELAÇÃO A SÍNTESE DE ATP, COMPLEXO RESPIRATÓRIO I, II, III E IV.**

Genes Síntese de ATP	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8	Sp9
atp1	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
atp4		X	X	X	X	X		XXX	XXX
atp6	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
atp8	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
atp9	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
Complexo I									
nad1	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad2		X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad3	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad4	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad4L	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad5	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad6		X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad7	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
nad8									
nad9		X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
Complexo II									
sdh2									
sdh3									
sdh4									
Complexo III									
cob	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
Complexo IV									
cox1	X	X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
cox2		X	X	X	X	X	X	XXX	XXX
cox3		X	X	X	X	X	X	XXX	XXX

 **Presença do gene**    X = número de genes  
 **Ausência do gene**

Legenda: Sp1 - *Prasiola crispa*; Sp2 - *Auxenochlorella protothecoides*; Sp3 - *Chlorella sorokiniana*; Sp4 - *Chlorella variabilis*; Sp5 - *Coccomyxa* sp. C-169; Sp6 - *Helicosporidium* sp.; Sp7 - *Prototheca wickerhamii*; SP8 - *Trebouxiophyceae* sp.; Sp9 - *Chlorella* sp

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em nossos resultados, observa-se que *P. crisper* apresenta os genomas mitocondrial e plastidial grandes, porém em relação ao número de genes, a espécie fica entre as espécies Trebouxiophyceae com menores conteúdos gênicos. *P. crisper* também não apresenta vários genes relacionados ao fotossistema I e II e a síntese de ATP no cloroplasto, funções estas importantes para o metabolismo de energia da planta. Na mitocôndria vários genes relacionados ao complexo oxidativo e a síntese de ATP estão ausentes, sendo essas funções cruciais para o sobrevivência do organismo. Uma hipótese possível é que esses genes tenham sido incorporados pelo genoma nuclear durante a evolução da planta, estudos futuros, como por exemplo, o sequenciamento do genoma nuclear de *P. crisper* poderão elucidar questões como esta.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Fechar os genomas mitocondrial e plastidial de *P. crispa*
- Sequenciar o genoma nuclear de *P. crispa*
- Realizar uma busca no genoma nuclear referente aos genes ausentes no genoma mitocondrial e plastidial.

## REFERÊNCIAS

BOCK, R.; KNOOP, V. **Genomics of Chloroplasts and Mitochondria**. Springer, v. 35, p. 72, 2012

BOCK, R. **Cell and Molecular Biology of Plastids**. Springer, p. 2, 2007.

BURGER, G. et al. **Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists**. *Genome Biology and Evolution*, v. 5, n. 2, p. 418–438, 2013.

DE CAMBIAIRE, J.-C. et al. **The chloroplast genome sequence of the green alga *Leptosira terrestris*: multiple losses of the inverted repeat and extensive genome rearrangements within the Trebouxiophyceae**. *BMC genomics*, v. 8, p. 213, 2007.

DE KONING, A. P.; KEELING, P. J. **The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured**. *BMC biology*, v. 4, p. 12, 2006.

GRAY, M.W.; BURGUER, G.; LANG, B.F. **Mitochondrial evolution**. *Science*, v. 283, p. 1476–1481, 1999.

HAMMANI, K.; GIEGÉ, P. **RNA metabolism in plant mitochondria**. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 6, p. 380–389, 2014.

JARVIS, P.; LÓPEZ-JUEZ, E. **Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids**. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 14, n. 12, p. 787–802, 2013.

JENSEN, P. E.; LEISTER, D. **Chloroplast evolution, structure and functions**. *F1000Prime Reports*, v. 6, n. June, p. 1–14, 2014.

JEONG, H. et al. **Plastid and mitochondrion genomic sequences from Arctic *Chlorella* sp. ArM0029B**. *BMC genomics*, v. 15, n. 1, p. 286, 2014.

KOSUGI, M. et al. **Comparative study on the photosynthetic properties of *prasiola* (chlorophyceae) and *nostoc* (cyanophyceae) from antarctic and non-antarctic sites**. *Journal of Phycology*, v. 46, n. 3, p. 466–476, 2010.

KUA, C. S. et al. **Reference-Free Comparative Genomics of 174 Chloroplasts**. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.

LARA, E.; CHATZINOTAS, A.; SIMPSON, A. G. B. *Andalucia* (n. gen.) - **The deepest branch within Jakobids (Jakobida; Excavata), based on morphological and molecular study of a new flagellate from soil**. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 112–120, 2006.

LELIAERT, F. et al. **Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae.** *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.

LEMIEUX, C.; OTIS, C.; TURMEL, M. **Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class Trebouxiophyceae.** *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, n. 1, p. 211, 2014.

LI, R. et al. **Complete Sequencing of Five Araliaceae Chloroplast Genomes and the Phylogenetic Implications.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. 1–15, 2013.

MONIZ, M. B. J. et al. **Molecular phylogeny of antarctic Prasiola (Prasiolales, Trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity.** *Journal of Phycology*, v. 48, p. 940–955, 2012.

PALMIERI, F. et al. **Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights.** *Plant Journal*, v. 66, n. 1, p. 161–181, 2011.

POMBERT, J.-F.; KEELING, P. J. **The mitochondrial genome of the entomoparasitic green alga helicosporidium.** *PloS one*, v. 5, n. 1, p. e8954, 2010.

PUTZKE, J. et al. **Comparative study of moss diversity in South Shetland Islands and in the Antarctic Peninsula.** *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 88, n. 1, 2015.

RINDI, F. **Reproduction and life history of the green alga Prasiola linearis Jao (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).** *Botanica Marina*, v. 53, n. 1, p. 1–7, 2010.

RINDI, F.; MCIVOR, L.; GUIRY, M. D. **The prasiolales (Chlorophyta) of atlantic Europe: An assessment based on morphological, molecular, and ecological data, including the characterization of Rosenvingiella radicans (KÜTZING) comb. nov.** *Journal of Phycology*, v. 40, n. 5, p. 977–997, 2004.

SAKAMOTO, W.; MIYAGISHIMA, S.; JARVIS, P. **Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance.** *The Arabidopsis Book*, v. 62, n. 1, p. 1, 2008.

TURMEL, M.; OTIS, C.; LEMIEUX, C. **The chloroplast genomes of the green algae pedinomonas minor, parachlorella kessleri, and oocystis solitaria reveal a shared ancestry between the pedinomonadales and chlorellales.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 26, n. 10, p. 2317–2331, 2009.

WOLFF, G. et al. **Complete Sequence of the Mitochondrial DNA of the Chlorophyte Alga Prototheca wikerhamii** *Journal of Molecular Biology*, v. 237, p. 75–86, 1994.

ZEMOLIN, A. P. P. et al. **Toxicity Induced by Prasiola crispa to Fruit Fly Drosophila melanogaster and Cockroach Nauphoeta cinerea: Evidence for Bioinsecticide Action.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 77, n. 1-3, p. 115–124, 2014.

## ANEXOS

Em anexo o artigo intitulado “Draft plastid and mitochondrial genomes from Antarctic algae *Prasiola crispera*” está no prelo para publicação no periódico Genome Announcements (ISSN: 2169-8287).



## Draft Plastid and Mitochondrial Genome Sequences from the Antarctic Alga *Prasiola crispera*

Evelise Leis Carvalho,<sup>a</sup> Gabriel da Luz Wallau,<sup>a</sup> Darlene Lopes Rangel,<sup>a</sup> Laís Ceschini Machado,<sup>a</sup> Alexandre Freitas da Silva,<sup>a</sup> Antonio Batista Pereira,<sup>b</sup> Filipe de Carvalho Victoria,<sup>b</sup> Juliano Tomazzoni Boldo,<sup>a</sup> Chariston André Dal Belo,<sup>a</sup> Paulo Marcos Pinto<sup>a</sup>

Applied Proteomics Laboratory, University of Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil<sup>a</sup>; Antarctic Studies Plant Core, National Institute of Antarctic Science and Technology for Environmental Research, University of Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil<sup>b</sup>

The organelle genomes of the Antarctic alga *Prasiola crispera* (Lightfoot) Kützing have been sequenced. The plastid and mitochondrial genomes have total lengths of 196,502 bp and 89,819 bp, respectively. These genomes have 21 putative photosynthesis-related genes and 18 oxidative metabolism-related genes, respectively.

Received 27 March 2015 Accepted 17 April 2015 Published XXX

Citation Leis Carvalho E, da Luz Wallau G, Lopes Rangel D, Ceschini Machado L, Freitas da Silva A, Batista Pereira A, de Carvalho Victoria F, Tomazzoni Boldo J, André Dal Belo C, Pinto PM. 2015. Draft plastid and mitochondrial genome sequences from the Antarctic alga *Prasiola crispera*. *Genome Announc* 3(3):e00435-15. doi:10.1128/genomeA.00435-15.

Copyright © 2015 Leis Carvalho et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Paulo Marcos Pinto, paulopinto@unipampa.edu.br.

Antarctica has attracted considerable interest from biologists interested in understanding the evolutionary adaptation of extremophile organisms (1). *Prasiola* spp. are the best-known Antarctic algae found at many terrestrial and supralittoral sites, representing the most important primary producers (1–3). The species most commonly reported is *Prasiola crispera* (Lightfoot) Kützing. *P. crispera* has several interesting biological features, typically growing on moist soils fertilized by penguin guano (4), and it tolerates repeated thaw cycles in the spring and fall, freezing over winter, and high levels of UV radiation during the summer (5).

The organelle DNA was sequenced by the Macrogen Service Center in a Solexa-Illumina HiSeq 2500 next-generation sequencing device, according to the manufacturer's instructions. A paired-end approach with a read size of ~100 bp was employed. Sequence assembly was performed with the SOAPdenovo2 software version 2.01 (6). All open reading frames (ORFs) were annotated using CpGAVAS (7) and Mitofy (8) for the chloroplast and mitochondrial genomes, respectively.

The *P. crispera* plastid genome (cpDNA) information resides on a single molecule with a total length of 196,502 bp and a G+C content of 29.32%. Compared with other species from the *Prasiola* clade, the genomes of *P. crispera* are among the largest (*Prasiolopsis* sp., 306.1 kb; *Pabia signiensis* T. Friedl & O'Kelly, 236.5 kb; *Koliella longiseta* (Vischer) Hindák, 197.1 kb; *Stichococcus bacillaris* Nägeli, 116.9 kb) (9) or even compared to those of other species close to *Prasiolales*, such as *Chlorella mirabilis* V. M. Andreyeva (168.0 kb) (9). The cpDNA comprises 32 putative coding genes, 27 tRNAs, and 2 rRNAs. Among those, we were able to annotate at least 21 putative protein-coding genes related to photosynthesis, such as photosystems I and II (*ycf3*, *psaB*, *psaC*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, *psbH*, *psbL*, *psbM*, *psbN*, and *psbT*).

The *P. crispera* mitochondrial genome (mtDNA) is the first mitochondrial sequenced genome from the *Prasiolales* order. It has a total of 89,819 bp and a G+C content of 29.29%; compared with other species from the *Trebouxiophyceae* class, *P. crispera* has the largest mtDNA (*Trebouxiophyceae* sp., 74.4 kb; *Chlorella* sp.

ArM0029B, 65.0 kb; *Oltmannsiellopsis viridis* [P. E. Hargraves & R. L. Steele] M. Chihara & I. Inouye, 56.8 kb; *Prototheca wickerhamii* Tubaki & Soneda, 55.3 kb; and *Chlorella sorokiniana* Shihira & R. W. Krauss, 52.5 kb) (10–14). The *P. crispera* mtDNA genome has the smallest gene content, with only 43 genes, comprising 18 putative protein-coding genes, 22 tRNAs, and 3 rRNAs. All of the annotated protein-coding genes were related to mitochondrial oxidative metabolism, such as mitochondrial respiratory chain complexes I, III, and IV (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad5*, *nad6*, *nad7*, *cobA*, and *cox1*).

These organelle genomes are the first draft genome sequences obtained from Antarctic *Trebouxiophyceae* algae. Mitochondria and chloroplast organelles play a pivotal role in energy metabolism and are great tools for taxonomic analysis in higher plants and algae. The plastid and mitochondrial genome data would be useful for further genetic studies, phylogenetic analysis, and resource protection of *P. crispera* and phylogenetic analysis of *Trebouxiophyceae* green algae.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The cpDNA and mtDNA contig sequences were deposited in GenBank under accession numbers KR017748, KR017749, and KR017750, and KR017746 and KR017747, respectively.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Brazil), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-Brazil), and the National Institute of Science and Technology - Antarctic Environmental Research (INCT-APA). E. Leis Carvalho received research fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-Brazil).

### REFERENCES

- Convey P. 2007. Biogeography, p 154–160. In Riffenburgh, B (ed), *Encyclopedia of the Antarctic*, vol 1, Routledge, New York, NY.
- Kováčik L, Pereira AB. 2001. Green alga *Prasiola crispera* and its lichenized



Leis Carvalho et al.

- form *Mastodia tessellata* in Antarctic environment: general aspects. *Nova Hedwigia Beiheft* 123:465–478.
- Wiencke C, Clayton MN 2002. In Antarctic seaweeds. Synopses of the Antarctic benthos, vol 9. A. R. G. Gantner Verlag K. G., Ruggell, Liechtenstein.
  - Graham LE, Graham JM, Wilcox LW. 2009. *Algae*. Pearson Education, San Francisco, CA.
  - Kosugi M, Katashima Y, Aikawa S, Tanabe Y, Kudoh S, Kashino Y, Koike H, Satoh K. 2010. Comparative study on the photosynthetic properties of *Prasiola* (*Chlorophyceae*) and *Nostoc* (*Cyanophyceae*) from Antarctic and non-Antarctic sites. *J Phycol* 46:466–476. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00831.x>.
  - Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu SM, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam TW, Wang J. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *GigaScience* 1:18. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-217X-1-18>.
  - Liu C, Shi L, Zhu Y, Chen H, Zhang J, Lin X, Guan X. 2012. CpGAVAS, an integrated Web server for the annotation, visualization, analysis, and GenBank submission of completely sequenced chloroplast genome sequences. *BMC Genomics* 13:715. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-715>.
  - Alverson AJ, Wei X, Rice DW, Stern DB, Barry K, Palmer JD. 2010. Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Mol Biol Evol* 27:1436–1448. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msq029>.
  - Lemieux C, Otis C, Turmel M. 2014. Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class *Trebouxiophyceae*. *BMC Evol Biol* 14:211. <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-014-0211-2>.
  - Wolff G, Plante I, Lang BF, Kück U, Burger G. 1994. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii*. Gene content and genome organization. *J Mol Biol* 237:75–86. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1210>.
  - Pombert JF, Beauchamp P, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2006. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis*: evolutionary trends of the mitochondrial genome in the *Ulvothyceae*. *Curr Genet* 50:137–147. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-006-0076-z>.
  - Servin-Garciduenas LE, Martínez-Romero E. 2012. Complete mitochondrial and plastid genomes of the green microalga *Trebouxiophyceae* sp. strain MX-AZ01 isolated from a highly acidic geothermal lake. *Eukaryot Cell* 11:1417–1418. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00244-12>.
  - Jeong H, Lim JM, Park J, Sim YM, Choi HG, Lee J, Jeong WJ. 2014. Plastid and mitochondrion genomic sequences from Arctic *Chlorella* sp. ARM0029B. *BMC Genomics* 15:286. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-286>.
  - Orsini M, Costelli C, Malavasi V, Cusano R, Concas A, Angius A, Cao G. 2014. Complete genome sequence of mitochondrial DNA (mtDNA) of *Chlorella sorokiniana*. *Mitochondrial DNA* 4:1–3. <http://dx.doi.org/10.3109/19401736.2014.953128>.