



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“Estudio de la distribución de los genes que codifican para las subunidades COX2A y COX2B de la citocromo oxidasa y para las subunidades ASA de la ATP sintasa, entre las algas verdes.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
LIBB. ELIZABETH RODRÍGUEZ SALINAS

DIRECTOR DE TESIS
DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

MÉXICO, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Diego González Halphen y con apoyos del Programa de Becas para Estudios del Posgrado del CONACYT (No. de Registro 203465) y de los donativos 128110 del CONACYT e IN203311-3 de la DGAPA (UNAM).

A Bernardo, por los sueños escritos letra por letra.

A mis padres y hermana, por su apoyo incondicional en la aventura cuántica que es la vida.

A mis suegros, entre personajes y risas miligramo.

“There must be mutation, swifter than iridescence, haste, not rest, come-and-go, not fixity, inconclusiveness, immediacy, the quality of life itself, without dénouement or close.”

Essay on Poetic Theory

D. H. Lawrence

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por siempre abrirme sus puertas al conocimiento.
- Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por darme una base sólida para la investigación.
- Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por ser mi casa durante estos años.
- Al Dr. Diego González Halphen por su comprensión, motivación y por transmitir su enseñanza día a día con entusiasmo.
- A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Imelda López Villaseñor, Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. Diego González Halphen.
- Al Dr. Jerry Brand (Department of Molecular Cell and Developmental Biology and Culture Collection of Algae, The University of Texas at Austin, EEUU) y a la Dra. Louise Lewis (Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut at Storrs, EEUU) por su apoyo incondicional con los cultivos de algas y la extracción de material genético.
- Al Dr. Héctor Riveros Rosas (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM) por su imprescindible ayuda con los análisis filogenéticos.
- A la técnico del laboratorio, la QBP Miriam Vázquez Acevedo por la asesoría y apoyo técnico brindado.
- A la Dr. Laura Ongay Larios, a la Maestra en Ciencias Minerva Mora Cabrera y a la Bióloga Guadalupe Códiz Huerta de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, que sin el apoyo brindado este trabajo no hubiera sido posible.
- A mis compañeros de laboratorio: Alexa, Alejandra, Miriam, Valentín, Héctor, Paco, Adelma, Araceli, Alain, Diana y Lili por compartir desinteresadamente sus conocimientos y alegrías en todo momento.
- Al Dr. Rafael Camacho Carranza, al Dr. Javier Espinoza Aguirre, a la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, a la Dra. Imelda López Villaseñor, y a Nancy Mora Pérez por su tiempo y confianza.
- Al auxiliar de laboratorio Alfredo Octaviano Sánchez por su infatigable labor.
- Finalmente un agradecimiento especial a los profesores asignados como jurado por su tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Índice

Resumen	9
Abstract	10
Introducción	
Eucariontes fotosintéticos	11-12
<i>Chlorophyta</i> : algas verdes	12-13
Clasificación de las algas verdes	13-16
A) Caracteres morfológicos	14
B) Caracteres ultraestructurales	15
C) Caracteres moleculares	15-16
Sistemática de algas verdes	16-19
Genómica de algas verdes	20-25
A) Genomas nucleares	20-21
B) Genomas mitocondriales	21-22
C) Genomas de cloroplasto	25
Genes fragmentados: el caso de <i>cox2</i>	25-29
Genes nuevos: el caso de las ASAs	29-30
Planteamiento del problema	31
Hipótesis	31
Objetivos	31
Materiales y Métodos	
Algas	32-33
Microscopía	33
Purificación de DNA	33
Diseño de oligonucleótidos	33-34
A) <i>cox2</i>	33
B) Extensión N-terminal de <i>S. obliquus</i>	34
C) <i>asa8</i>	34

Amplificación de DNA	34-36
A) <i>cox2</i>	35
B) Extensión N-terminal de <i>S. obliquus</i>	35
C) <i>asa8</i>	36
Clonación y secuenciación	36
Análisis <i>in silico</i>	36-37
A) BLASTs	36
B) Análisis de secuencias	36-37
Análisis filogenético	37

Resultados

Cultivos	38
Identificación del gen <i>cox2</i> ortodoxo o fragmentado en algas clorofitas	38-45
Presencia de intrones en los genes nucleares <i>cox2a</i> y <i>cox2b</i>	45-47
Análisis de las secuencias correspondientes a los genes <i>cox2</i> , <i>cox2a</i> y <i>cox2b</i>	48-51
Identificación de MTS en el gen <i>cox2a</i> y de extensiones en los genes <i>cox2a</i> y <i>cox2b</i>	52-54
Grupos de algas clorofíceas con base en la localización del gen <i>cox2a</i>	54
Análisis filogenético de las algas clorofíceas con base en los genes <i>cox2</i> , <i>cox2a</i> y <i>cox2b</i>	55-58
Identificación de proteínas ASA	59

Discusión

Transferencia del gen <i>cox2</i> al núcleo: completo y fragmentado	60-61
Modelo de la fragmentación y transferencia del gen <i>cox2</i> al núcleo en algas clorofíceas	61-63
Evidencias que apoyan al modelo	63-65
El gen <i>cox2</i> como marcador molecular en algas clorofíceas	65-67
Identificación de proteínas ASA	67-68

Conclusiones	68
---------------------	----

Perspectivas	69
---------------------	----

Bibliografía	70-74
---------------------	-------

Artículos	75-146
------------------	--------

Índice de figuras

Figura 1. Origen de los eucariontes fotosintéticos	12
Figura 2. Reino <i>Viridiplantae</i>	14
Figura 3. Tipos de aparatos flagelares en clorofitas	16
Figura 4. Relaciones filogenéticas entre clorofíceas	18
Figura 5. Complejo IV o citocromo c oxidasa	28
Figura 6. Genes y proteínas	29
Figura 7. Composiciones diferentes del estator del Complejo V o ATP sintasa	30
Figura 8. Microscopía de algas clorofitas	38
Figura 9. Comparación de secuencias de los polipéptidos COXII, COXIIA y COXIIB	39
Figura 10. Estrategia para la amplificación de genes <i>cox2</i> ortodoxos y fragmentados	40
Figura 11. Amplificación de fragmentos de los genes <i>cox2</i> , <i>cox2a</i> y <i>cox2b</i>	41
Figura 12. Intrones presentes en los genes nucleares <i>cox2a</i> y <i>cox2b</i>	46
Figura 13. Preferencia de nucleótidos en la tercera posición	48
Figura 14. Alineamiento múltiple de COXII	49-51
Figura 15. Presecuencias de localización mitocondrial (MTS)	53-54
Figura 16. Extensiones codificadas por los genes <i>cox2a</i> y <i>cox2b</i>	54
Figura 17. Análisis filogenético de las proteínas COXII de clorofitas	55-58
Figura 18. Alineamiento de ASA8	59
Figura 19. Fragmentación y transferencia del gen <i>cox2</i> mitocondrial	63
Figura 22. Cladograma que ilustra la asociación entre tipos de clorofíceas, configuración del cuerpo basal del flagelo y orden taxonómico	67

Índice de tablas

Tabla 1. Características de los principales linajes de algas clorofitas	19
Tabla 2. Características de los principales órdenes de algas clorofíceas	19
Tabla 3. Genomas secuenciados de algas clorofitas	23-24
Tabla 4. Genes mitocondriales que codifican proteínas de la cadena respiratoria	27
Tabla 5. Aislados de algas clorofitas utilizados	32
Tabla 6. Oligonucleótidos para <i>cox2</i>	34
Tabla 7. Números de acceso en GenBank	42-43
Tabla 8. Distribución del gen <i>cox2</i> ortodoxo y fragmentado en algas verdes	44-45
Tabla 9. Análisis de intrones	47
Tabla 10. Subunidades ASA presentes en algas clorofíceas	59

Resumen

En la mayoría de los eucariontes la subunidad II de la citocromo c oxidasa (COXII) está codificada por un gen mitocondrial. No obstante, en algunas algas clorofíceas el gen *cox2* está fragmentado en dos genes, *cox2a* y *cox2b*, localizados en el genoma nuclear. Cada gen codifica un polipéptido (COXIIA y COXIIB) que interaccionan entre sí para formar una subunidad COXII heterodimérica. En este trabajo se analizó la distribución del gen *cox2* en 46 aislados de algas verdes (*Chlorophyta*), y se exploró si cada gene estaba intacto o fragmentado. La ubicación de los genes se clasificó como nuclear o mitocondrial con base en los siguientes criterios: frecuencia de nucleótidos en la tercera posición, presencia de intrones y similitud en las secuencias (*i.e.* se encontraron firmas de aminoácidos características para COXIIA y B mitocondriales o nucleares). Los resultados obtenidos apoyan observaciones anteriores que indican que las algas de las clases *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae* contienen un gen *cox2* ortodoxo (*i.e.* intacto y mitocondrial). En cambio, todas las algas analizadas pertenecientes a la clase *Chlorophyceae* contienen genes *cox2* fragmentados y con base a la localización de cada uno de ellos se dividen en dos grupos: (1) tipo *Scenedesmus*, el gen *cox2b* se localiza en el genoma nuclear y el gen *cox2a* en el genoma mitocondrial, y (2) tipo *Chlamydomonas*, ambos genes se localizan en el genoma nuclear. También, se propone un modelo que describe los posibles acontecimientos que condujeron a la fragmentación mitocondrial del gen *cox2* y a la migración independiente y secuencial de los genes *cox2a* y *cox2b* de la mitocondria al genoma nuclear de algas clorofíceas. Finalmente, las secuencias obtenidas se analizaron en un contexto filogenético y los árboles construidos son congruentes con los diversos linajes de algas clorofíceas y también correlacionan con algunos aspectos morfológicos de las algas verdes (*i.e.* cuerpo basal del flagelo).

Abstract

In most eukaryotes subunit II of cytochrome *c* oxidase (COXII) is encoded by a single mitochondrial gene. However, in some chlorophycean algae this gene is fragmented into two nuclear genes, *cox2a* and *cox2b*. Each gene encodes a polypeptide, COXIIA and COXIIB, respectively, which interact to form a heterodimeric COXII subunit. In this study we analyze the distribution of the *cox2* gene in 46 green algae isolates (Chlorophyta), and whether it is intact or fragmented. The location of the genes was classified as either nuclear or mitochondrial using the following criteria: frequency of nucleotides in the third position, presence of introns and sequence similarity (*i.e.* consecutive amino acids characteristic of mitochondrial or nuclear COXIIA and COXIIB). The results support previous observations that the classes *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* and *Trebouxiophyceae* contain an orthodox *cox2* gene. In contrast, all analyzed algae belonging to the class *Chlorophyceae* contain fragmented *cox2* genes, and based on their location, chlorophycean algae are divided into two groups: (1) *Scenedesmus*-like, in which the gene *cox2b* is located in the nuclear genome while the gene *cox2a* is located in the mitochondrial genome, and (2) *Chlamydomonas*-like, in which both genes are located in the nuclear genome. Also, we propose a model that describes the possible events that led to mitochondrial *cox2* fragmentation and to the independent and sequential migration of genes *cox2a* and *cox2b* in chlorophycean algae. Finally, the sequences obtained were analyzed in a phylogenetic context and the results hypothesize a correlation between the types of chlorophycean algae and morphological aspects of green algae (*i.e.* flagellar basal bodies).

Introducción

Eucariontes fotosintéticos

La teoría del endosimbionte serial propone que los organelos de células eucariontes, la mitocondria y el cloroplasto, constituyen los vestigios de organismos que en algún momento fueron de vida libre (Margulis 1967). La evidencia bioquímica, molecular y filogenética sugiere que la mitocondria proviene de un ancestro de las α -proteobacterias y el cloroplasto de un ancestro de las cianobacterias (Margulis 1967, Poole 2006).

Hace aproximadamente 2400 a 2800 millones de años la fotosíntesis oxigénica probablemente se originó en los ancestros de las cianobacterias (Buick 1992). La aparición de este proceso metabólico revolucionó la vida sobre la Tierra. En este tipo de fotosíntesis las moléculas de agua son el donante primario de electrones para la reducción del bióxido de carbono y el principal subproducto es el oxígeno, que es liberado al ambiente (Dismukes 2000). La consecuente producción de oxígeno condujo eventualmente a la oxigenación de los océanos y de la atmósfera (Holland 2006), teniendo consecuencias drásticas para la vida primitiva predominantemente anaeróbica (Cavalier-Smith 2006). Distintas formas de vida procarionte capaces de contender con la creciente cantidad de oxígeno en la atmósfera evolucionaron: organismos con un metabolismo capaz de reducir las concentraciones de oxígeno local mediante la oxidación de carbohidratos y de producir energía en la forma de ATP con la consecuente eliminación de bióxido de carbono y agua (*i.e.* respiración metabólica) (Margulis 1967).

El primer evento de endosimbiosis, de acuerdo con la teoría del endosimbionte serial, consistió en la internalización de un procarionte aeróbico (*i.e.* ancestro de las α -proteobacterias) por un organismo proto-eucarionte o bien por un procarionte, probablemente una arquea ancestral (Martin 1998, Poole 2006) (Figura 1A). Esta endosimbiosis resultó en la generación de los organismos eucariontes aeróbicos (Margulis 1967). En un linaje de los eucariontes ocurrió una segunda endosimbiosis. Se estima que ésta tuvo lugar hace más de 1600 millones de años (Yoon 2004) y consistió en la internalización de un procarionte heterótrofo (*i.e.* ancestro de las cianobacterias) por un eucarionte aeróbico que ya contaba con mitocondrias. Así, surgieron organismos eucariontes capaces de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica (Margulis 1967) (Figura 1B).

Los organismos eucariontes fotosintéticos se han agrupado bajo el término archaeplastida (sin categoría taxonómica asignada) que proviene de la raíz griega "*archaios*" que significa antiguo. Así, este término comprende a los plástidos denominados "primarios." Éstos son los cloroplastos que se originaron a partir de un proceso de endosimbiosis con cianobacterias. Los únicos organismos eucariontes que presentan plástidos primarios son: las algas rojas o *Rhodophyta*, las microalgas de agua dulce o *Glaucophyta*, y las algas verdes y plantas terrestres o *Chlorophyta* (Rodríguez-Ezpeleta 2005, Baldauf 2008) (Figura 1).

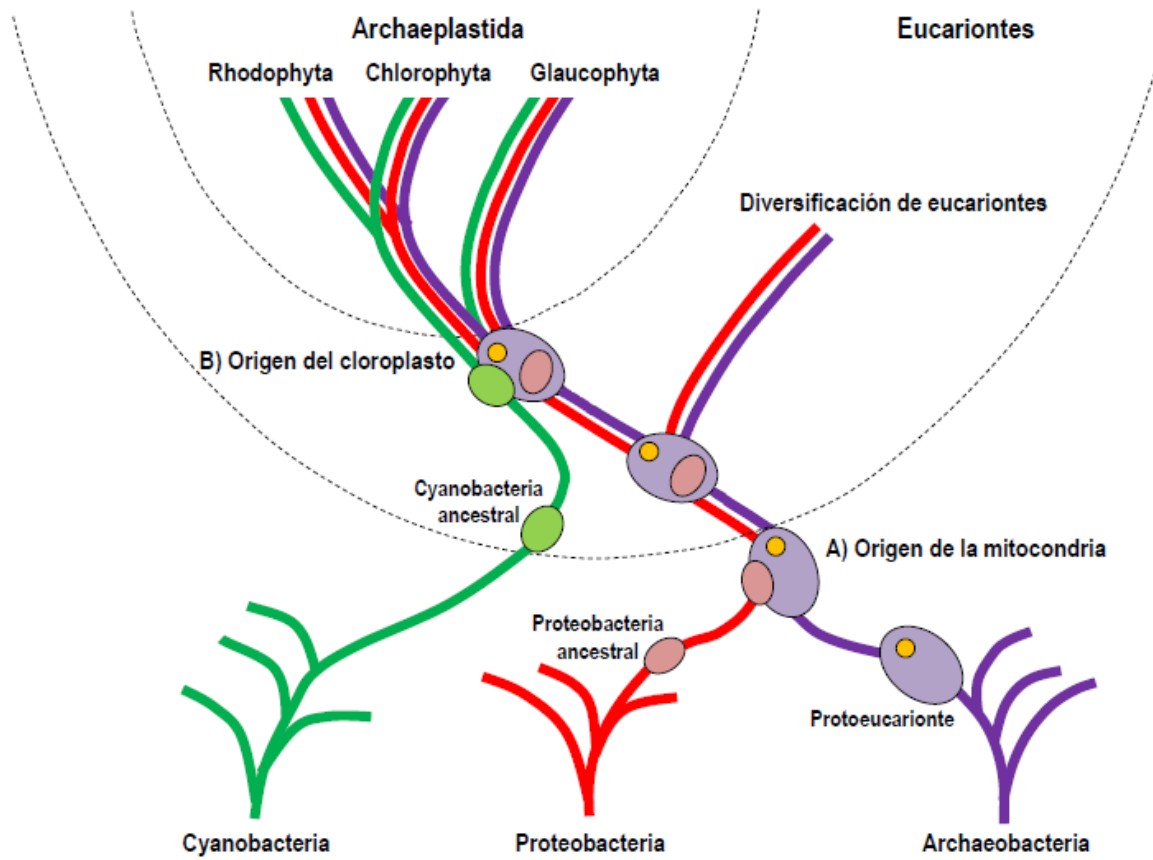


Figura 1. Origen de los eucariontes fotosintéticos (modificado de Timmis 2004). La teoría del endosimbionte serial propone que los organelos de células eucariontes, la mitocondria y el cloroplasto se originaron a partir de las proteobacterias y cianobacterias, respectivamente. A) El primer evento endosimbiótico consistió en la internalización de una proteobacteria ancestral por un protoeucarionte o por una arquea. Los organismos que surgieron de este evento se diversificaron y dieron origen a los principales grupos de eucariontes. B) El segundo evento endosimbiótico consistió en la internalización de una cianobacteria ancestral por un eucarionte aeróbico que ya contenía mitocondrias. Los organismos fotosintéticos que surgieron se diversificaron y actualmente comprenden a los eucariontes fotosintéticos que contienen plastidos primarios o archaeoplastidos: las algas rojas (*Rhodophyta*), las microalgas de agua dulce (*Glaucophyta*), y las algas verdes y plantas terrestres (*Chlorophyta*).

Chlorophyta: algas verdes

En el contexto taxonómico, las algas verdes y las plantas terrestres conforman el reino *Viridiplantae* que se divide en dos phyla: *Chlorophyta* (algas verdes) y *Streptophyta* (algas charophytas y plantas terrestres). La relación entre ambos grupos se ha vislumbrado desde hace siglos (Lewis 2004). Se cree que hace más de 470 millones de años un ancestro común de ambos phyla hizo la transición de un ambiente acuático a uno terrestre, resultando en el ancestro de las plantas terrestres (Lewis 2004, Turmel 2006) (Figura

2). Esta hipótesis ha sido apoyada recientemente por datos genómicos y filogenéticos que proponen que el ancestro común perteneció al grupo de algas charophytas contemporáneas (Lemieux 2000, Turmel 2006).

Las algas verdes o clorofitas tienen cloroplastos que están rodeados por una doble membrana; que contienen los pigmentos fotosintéticos clorofila *a* y *b*, y pigmentos accesorios (derivados carotenoides y xantofilinas); también acumulan almidón, como principal producto de almacenamiento de la glucosa (Margulis 1990). Actualmente, se han descrito aproximadamente 500 géneros y 16000 especies de clorofitas (Margulis 1998). La literatura respecto a las especies conocidas es vasta y la gran mayoría de los aislados se mantienen en cultivo en las siguientes colecciones: SAG, en la Universidad de Göttingen (<http://sagdb.uni-goettingen.de/>); UTEX, en la Universidad de Texas (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>); la CCAC, en la Universidad de Köln (<http://www.ccac.uni-koeln.de/>); NIES, en el Instituto Nacional de Investigaciones Ambientales de Japón (<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/top.jsp>) y SAMS, en el Instituto Escocés de Ciencias del Mar (<http://www.sams.ac.uk/facilities/uk-national-facilities/culture-collection-of-algae-and-protozoa>).

El ciclo reproductivo de las algas verdes es normalmente por alternación de generaciones: la fase haploide o asexual alterna con una fase diploide o sexual. La forma diploide de las algas, también denominada esporofito, produce esporas haploides mediante divisiones meióticas sucesivas. En las condiciones ambientales propicias, las esporas germinan y forman organismos nuevos denominados gametofitos, cuyas células son haploides. Posteriormente, los gametofitos producen gametos por meiosis. Los gametos son femeninos (positivos) y masculinos (negativos) y de acuerdo a sus tamaños se clasifican en las siguientes condiciones: isogamia (*i.e.* los gametos son del mismo tamaño), anisogamia (*i.e.* el gameto masculino es menor que el femenino) y oogamia (*i.e.* el gameto más grande es inmóvil). Finalmente, los gametos se fusionan, ya sea entre ellos mismos o con gametos provenientes de otros organismos, y desarrollan un nuevo esporofito diploide (Curtis 1993).

Clasificación de las algas verdes

La clasificación de las clorofitas ha sido un tema controvertido desde que en 1753 Linneo las incluyó en su clasificación del reino *Plantae* (Moestrup 2001). El problema principal radica en la gran diversidad que presentan los caracteres utilizados. Tradicionalmente se han utilizado caracteres morfológicos y ultraestructurales, bajo la hipótesis de que éstos son filogenéticamente informativos dado que se han mantenido relativamente constantes a lo largo de su historia evolutiva (Stewart 1975).

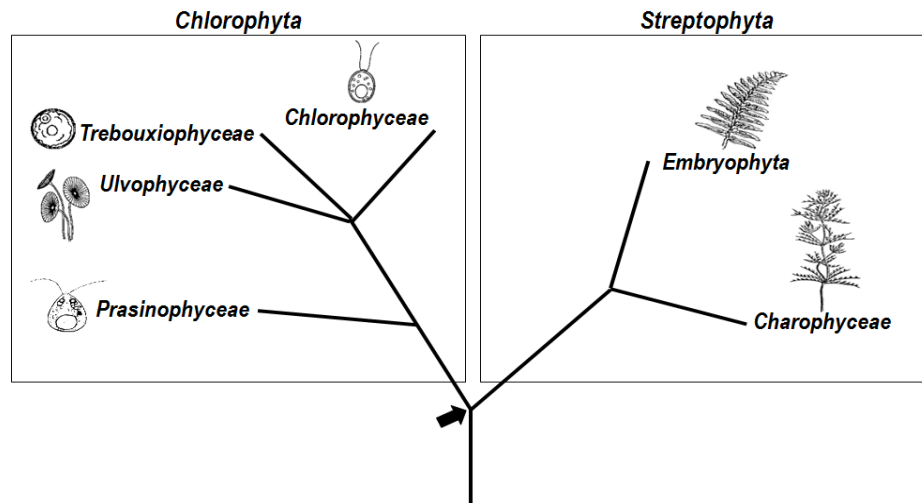


Figura 2. Reino Viridiplantae (modificado de Archibald 2009). El árbol filogenético esquematiza el reino *Viridiplantae* que está compuesto por dos *phyla*: (1) *Chlorophyta*, que contiene a las algas clorofíceas o algas verdes, y (2) *Streptophyta*, que contiene a las algas carófitas y a las embriófitas o plantas terrestres. La flecha indica el último ancestro común de ambos *phyla*.

A) Caracteres morfológicos.

En las últimas décadas de 1700, las clorofitas eran consideradas como animales, con base en su estado unicelular biflagelado móvil y fue hasta 1800 que fueron reclasificadas como parte del reino *Plantae* (Moestrup 2001). Cien años más tarde, las algas verdes se clasificaron con base en características morfológicas similares, específicamente de acuerdo al nivel de organización que muestran en su estado vegetativo (Pröschold 2007). Las clorofitas presentan una extensa variedad en su complejidad celular que abarca organismos unicelulares y multicelulares (van den Hoek 1995): (1) unicelulares de vida libre con una estructura monadoide (*i.e.* células individuales flageladas móviles) o coccoide (*i.e.* células individuales esféricas no móviles); (2) multicelulares filamentosas (*i.e.* células cilíndricas ordenadas extremo con extremo), sarcinoides (*i.e.* células que crecen en tres dimensiones formando paquetes cúbicos) o parenquimales (*i.e.* células en forma de láminas que se dividen en dos o más planos generando varias capas); (3) plurinucleares con una estructura cenocítica o sifonal (*i.e.* células conectadas por sincicios y que carecen de tabiques transversales); (4) coloniales en donde las células funcionan de manera independiente y pueden estar contenidas en una matriz extracelular compuesta por polisacáridos (mucílago). También, existen géneros de clorofitas multicelulares que consisten en esferas que contienen colonias de miles o cientos de células (dependiendo de la especie) unidas entre sí por hebras de citoplasma. Las células presentan especialización de función: la mayoría (miles) son somáticas y flageladas, y participan en el desplazamiento; mientras que la minoría (decenas) son germinales, y participan en el crecimiento y la reproducción (Curtis 1993, Herron 2009).

B) Caracteres ultraestructurales.

En 1975 Stewart y Mattox propusieron una clasificación basada en la orientación del cuerpo basal del aparato flagelar y en diferencias en la mitosis y citocinesis (Stewart 1975). Todas las clorofitas pasan por un estado unicelular biflagelado (espora y/o gameto) durante su ciclo reproductivo. Los aparatos flagelares están compuestos por los cuerpos basales y las raíces flagelares. Los cuerpos basales consisten en arreglos cilíndricos de microtúbulos y se localizan en la base del flagelo. Las raíces flagelares son grupos de microtúbulos que se unen al cuerpo basal del flagelo. Se han descrito tres orientaciones características de cuerpos en algas verdes (Pröschold 2007) (Figura 3). El primero tiene los cuerpos basales desfasados en sentido contrario a las manecillas del reloj y se denomina CCW (por las siglas en inglés de Counter Clock Wise) (Figura 3A). El segundo tiene en los cuerpos basales orientados en direcciones directamente opuestas y se denomina DO (por las siglas en inglés de Directly Opposed) (Figura 3B). El tercero tiene los cuerpos basales desfasados en sentido de las manecillas del reloj y se denomina CW (por las siglas en inglés de Clock Wise) (Figura 3C). Las diferencias en la mitosis y citocinesis en clorofitas en las que se basaron Stewart y Mattox para su sistema de clasificación incluyen un huso mitótico abierto o cerrado y estructuras compuestas por microtúbulos involucradas en la citocinesis. El huso mitótico durante la metafase puede ser cerrado (*i.e.* presencia de envoltura nuclear) o abierto (*i.e.* la envoltura nuclear se rompe durante la mitosis). Las estructuras compuestas por microtúbulos se denominan fragmoplasto y ficoplasto. La primera consiste en microtúbulos antiparalelos perpendiculares al plano de división y la segunda consiste en microtúbulos paralelos al plano de división. Los caracteres estructurales han permitido hacer una clasificación de las algas verdes a gran escala, no obstante, la limitante principal es ante taxa que son morfológicamente idénticos, probablemente resultado de eventos de evolución convergente, o que carecen de los caracteres representativos de un grupo (Lewis 2004).

C) Caracteres moleculares.

En la década de los 90's, el uso de marcadores moleculares proporcionó una nueva perspectiva respecto a la clasificación de las algas verdes: la filogenética molecular; que consiste en la construcción de filogenias, a partir de las secuencias obtenidas de marcadores moleculares, con el fin de identificar y comprender las relaciones evolutivas entre las clorofitas. Los marcadores moleculares consisten en genes que tienen las siguientes características: (1) están o no presentes y por lo tanto no hay ambigüedad respecto al observador; (2) son heredables de manera vertical; (3) son estables, tienen poca variación a nivel genético entre los miembros de una misma especie; (4) por excelencia, son secuencias del cistrón ribosomal y de genes o proteínas de mitocondria o cloroplasto. El uso de marcadores moleculares ha corroborado la clasificación a gran escala de los grupos principales de clorofitas. También, ha permitido distinguir y delimitar

géneros y especies que resultaban ambiguos utilizando caracteres ultraestructurales o morfológicos (Lewis 2004), ya que variaban dependiendo del observador, de la preparación para microscopia y del muestreo. También, los caracteres moleculares han revelado que la diversidad a nivel molecular en las clorofitas es mucho mayor de lo que se creía, esto se ha visto reflejado en la incapacidad de resolver las relaciones filogenéticas entre y en los principales grupos de clorofitas. Consecuentemente, las filogenias presentan ramas internas muy cortas con un bajo nivel de confianza (bootstrap) que pueden atribuirse a: (1) la tasa de variación entre secuencias; (2) efectos de homoplasia (*i.e.* el mismo carácter emergió de manera independiente); (3) la falta de representatividad, ya sea porque la longitud del marcador o el muestreo de taxa son insuficientes; o (4) eventos de radiaciones evolutivas en un periodo corto (Pröschold 2007). Alternativamente, se ha recurrido a análisis filogenéticos con múltiples marcadores moleculares (*e.g.* genes nucleares, mitocondriales y de cloroplasto) (Pröschold 2001, Pröschold 2007, Turmel 2008, Brouard 2010).

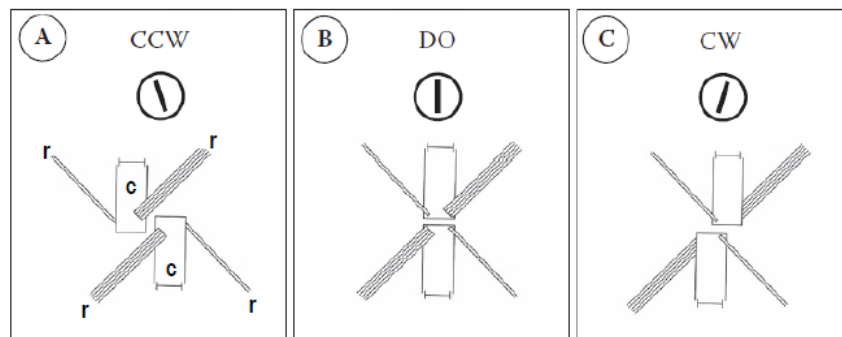


Figura 3. Tipos de aparatos flagelares en clorofitas (modificado de Pröschold 2007). Los aparatos flagelares usualmente comprenden de dos a cuatro cuerpos basales (c) con sus respectivas raíces (r). A) Tipo CCW (por las siglas en inglés de Counter Clock Wise), los cuerpos basales están desfasados en sentido contrario a las manecillas del reloj. B) Tipo DO (por las siglas en inglés de Directly Opposed), los cuerpos basales orientados en direcciones directamente opuestas. C) Tipo CW (por las siglas en inglés de Clock Wise), los cuerpos basales desfasados en sentido de las manecillas del reloj.

Sistemática de algas verdes

El phylum *Chlorophyta* está compuesto por cuatro clases principales: un grupo parafilético denominado *Prasinophyceae* (algas prasinofíceas) (Turmel 2009), y tres grupos denominados *Trebouxiophyceae* (algas trebouxofíceas), *Ulvophyceae* (algas ulvofíceas) y *Chlorophyceae* (algas clorofíceas) (van den Hoek 1995, Nakayama 1998, Lewis 2004) (Figura 2). Aun no se ha llegado a un consenso con respecto a la relación filogenética que existe entre los últimos tres grupos. Existe una quinta clase, *Pedinophyceae*, pero su posición como tal en la clasificación taxonómica de las algas verdes todavía es controversial (Lewis 2004). Esta clasificación es un consenso basado en combinaciones de caracteres

morfológicos y ultraestructurales (Tabla 1) que ha sido confirmada mediante análisis filogenéticos (Stewart 1975, Lewis 2004, Pröschold 2007). Las relaciones que existen entre las tres clases anteriores continúan siendo objeto de debate en la actualidad, no obstante, la evidencia filogenética sugiere que la clase *Trebouxiophyceae* constituye un grupo hermano de las clases *Ulvophyceae* y *Chlorophyceae* (Pombert 2004). La quinta clase, *Pedinophyceae*, comprende solamente dos géneros (*Pedinomonas* y *Resultor*), sin embargo, la posición filogenética que ocupa en el phylum *Chlorophyta* aún no se ha determinado (Lewis 2004). El aparato flagelar de los miembros de la clase *Pedinophyceae* se caracteriza por tener dos cuerpos basales, uno con flagelo y otro con un vestigio de flagelo. Con base en estas características se ha sugerido que las algas pedinofíceas son formas “primitivas” de algas prasinofíceas o formas “reducidas” de algas ulvofíceas (Margulis 1990). No obstante, el análisis del genoma mitocondrial del alga *Pedinomonas minor* sugiere que las algas pedinofíceas compartieron un ancestro común con las algas clorofíceas (Turmel 1999) (ver sección 5.2 Genomas mitocondriales).

La evidencia morfológica, ultraestructural y molecular sugiere que las clases *Prasinophyceae*, *Trebouxiophyceae* y *Ulvophyceae* no son monofiléticas, sino que cada una conforma un grupo que está compuesto por varios linajes independientes (van den Hoek 1995, Lewis 2004, Pröschold 2007). Por el contrario, la clase *Chlorophyceae* sí es monofilética (Lewis 2004). El uso de marcadores moleculares, específicamente el gen ribosomal 18S, ha permitido describir cinco órdenes principales en las clorofíceas: Chlamydomadales, Sphaeropleales, Chaetophorales, Chaetopeltidales y Oedogoniales (Lewis 2004). Además, los miembros de cada uno de estos órdenes exhiben una combinación de caracteres morfológicos y ultraestructurales específicos (O’Kelly 1984) (Tabla 2). Por ejemplo, las clorofíceas exhiben conformaciones únicas respecto a la orientación del cuerpo basal del flagelo que se cree surgieron en etapas tardías de la historia evolutiva de las algas clorofitas (O’Kelly 1984).

Análisis filogenéticos basados en múltiples genes de cloroplasto sugieren que los órdenes Oedogoniales, Chaetophorales y Chaetopeltidales conforman el clado OCC, mientras que los órdenes Chlamydomadales y Sphaeropleales conforman el clado denominado CS (Turmel 2008, Brouard 2010) (Figura 4). La posición filogenética entre Oedogoniales, Chaetophorales y Chaetopeltidales continúa siendo un tema controvertido. Algunos autores sugieren que el orden Oedogoniales constituye la rama más antigua y por lo tanto la consideran como una clase aparte (O’Kelly 1984, Shoup 2003, Lewis 2004). Por otro lado, análisis filogenéticos basados en genomas de cloroplasto sugieren que los órdenes Chaetophorales y Chaetopeltidales son hermanos (Brouard 2010) (Figura 4).

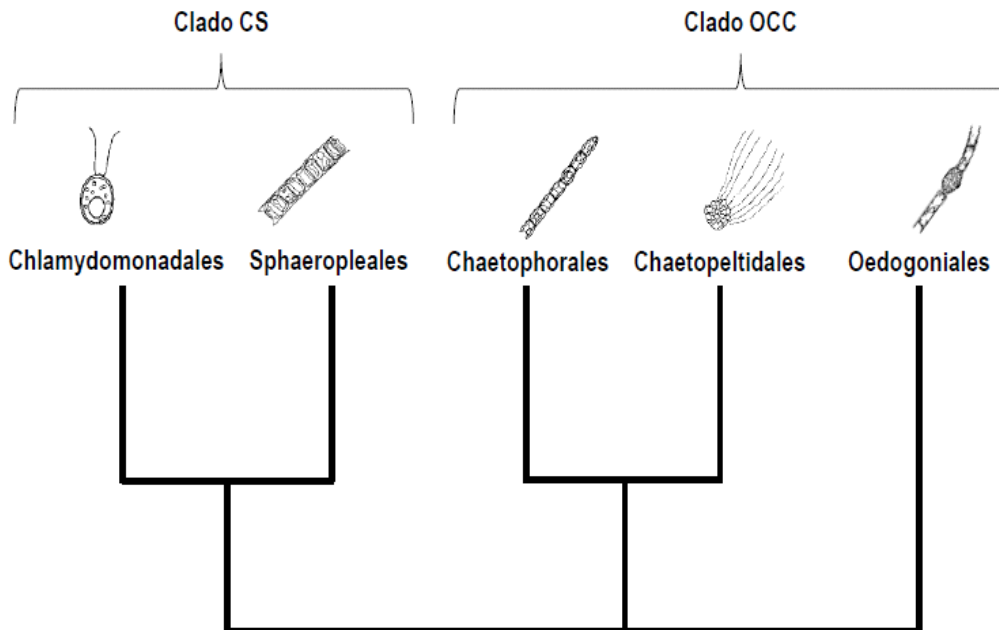


Figura 4. Relaciones filogenéticas entre clorofíceas (modificado de Lewis 2004). Representación esquemática del probable posicionamiento de los órdenes de las clorofíceas. El orden Oedogoniales se indica como un grupo parafilético de los órdenes Chaetophorales y Chaetopeltidales.

El problema principal radica en que las filogenias obtenidas presentan una combinación de ramas internas cortas y ramas externas largas que pueden atribuirse a problemas en la secuencia (*e.g.* marcador de longitud insuficiente o presencia de secuencias homólogas) o a radiaciones evolutivas rápidas (*i.e.* fenómenos de adaptación que conllevan a la especiación y a la invasión de diferentes nichos ecológicos) (Pröschold 2007). Recientemente se han utilizado múltiples genes y se ha incrementado el número de taxa analizado con el fin de tener una mejor representatividad. Las filogenias obtenidas presentan una mejor resolución, pero aún así es insuficiente (Pröschold 2001, Shoup 2003, Turmel 2008, Brouard 2010). Asimismo, los caracteres moleculares en conjunto no representan necesariamente la variación que existe a nivel de genoma, ni las adaptaciones que les permiten sobrevivir ante cambios ambientales drásticos (*i.e.* radiaciones evolutivas rápidas).

Tabla 1. Características de los principales linajes de algas clorofitas (Stewart 1975, van den Hoek 1995 y Lewis 2004).

Clase	Caracteres morfológicos	Caracteres ultraestructurales			Tipo de reproducción	Hábitats y nicho ecológico
		Cuerpo basal	Huso mitótico	Citocinesis		
<i>Prasinophyceae</i>	Unicelulares flageladas o coccoideas cubiertas por escamas orgánicas.	CCW	Abierto	Fragmoplasto	Asexual	Acuáticas: agua salada y dulce Endosimbióticas
<i>Ulvophyceae</i>	Unicelulares flageladas y no flageladas. Multicelulares filamentosas y sifonales (macroalgas bénticas).	CCW	Abierto	Fragmoplasto	Asexual y sexual por alternación de generaciones.	Acuáticas: agua salada Endofíticas, endozoicas y patógenas
<i>Trebouxiophyceae</i>	Unicelulares no flageladas. Multicelulares filamentosas.	CCW	Cerrado	Ficoplasto	Asexual y sexual (poco frecuente).	Acuáticas: agua dulce Terrestres Endosimbióticas, endozoicas y parasíticas
<i>Chlorophyceae</i>	Unicelulares flageladas y no flageladas. Multicelulares filamentosas y coloniales.	DO y CW	Cerrado	Ficoplasto	Asexual y sexual por alternación de generaciones.	Acuáticas: agua dulce Terrestres Climas extremos: desierto, nieve, halita Endosimbióticas, epizóicas, endozoicas
<i>Pedinophyceae</i>	Unicelulares flageladas. Ocasionalmente cubiertas por escamas orgánicas*	CCW**	Abierto	Fragmoplasto	Asexual	Acuáticas: agua salada Endosimbióticas

*La morfología de las escamas es diferente a la de la clase *Prasinophyceae*.

**Uno de los cuerpos basales del aparato flagelar carece de flagelo.

Tabla 2. Características de los principales órdenes de algas clorofíceas (O'Kelly 1984 y Lewis 2004).

Orden	Caracteres morfológicos		Caracteres ultraestructurales
	Esporas o gametos	Estado vegetativo	Orientación de los cuerpos basales
Chlamydomonadales	Unicelulares no móviles. Unicelulares móviles con 2 a 4 flagelos.	Coloniales. Multicelulares filamentosas.	CW
Sphaeropleales	Unicelulares no móviles.	Coloniales.	DO
Chaetophorales	Unicelulares móviles con 4 flagelos.	Multicelulares filamentosas.	DO + CW
Chaetopeltidales	Unicelulares móviles con 4 flagelos.	Multicelulares sarcinoides.	DO
Oedogoniales	Unicelulares móviles multiflagelares.	Multicelulares filamentosas.	Los cuerpos basales están interconectados, formando una corona: estefanoconto

Genómica de algas verdes

El número de genomas de algas verdes secuenciados va en constante aumento (Tabla 3). La primera alga en ser completamente secuenciada, fue el alga clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii*: genoma mitocondrial (Vahrenholz 1993), genoma de cloroplasto (Maul 2002) y genoma nuclear (Merchant 2007). Posteriormente siguieron los genomas nucleares de las prasinofíceas *Micromonas* sp. (Worden 2009) y *Ostreococcus* sp. (Robbens 2007) y la trebouxofícea *Coccomyxa* sp., sin embargo, los genomas nucleares de éstas aún no han sido completamente anotados. El análisis de los genomas desde una perspectiva evolutiva, ha revelado una gran diversidad que refleja un alto grado de dinamismo y plasticidad a nivel genómico.

A) Genomas nucleares.

Actualmente se han secuenciado cinco genomas nucleares de algas prasinofíceas. Éstas constituyen una parte importante de los ecosistemas marinos (picofitoplancton), sin embargo la contribución de cada grupo o especie se desconoce (Worden 2009). Los genomas nucleares secuenciados de dos aislados diferentes de *Micromonas* sp. comparten un 90% de identidad entre sí y se consideran como especies distintas. Las principales diferencias radican en la presencia o ausencia de distintos arreglos de riboswitches, de elementos repetidos y de transportadores. Los genes compartidos por ambas especies se han utilizado como plataforma para inferir la composición genética del último ancestro común entre algas verdes y plantas. Por ejemplo, las algas prasinofíceas del género *Micromonas* presentan factores de transcripción de la familia YABBY que se han asociados al desarrollo de hojas; pero éstos están ausentes en otros géneros de prasinofíceas (e.g. *Ostreococcus*) y en clorofíceas. Las prasinofíceas, a diferencia de las plantas, no presentan reproducción sexual. Sin embargo, en las primeras, se han encontrado genes que codifican proteínas asociadas a la meiosis y a la fusión sexual (e.g. glicoproteínas ricas en hidroxiprolina que se expresan exclusivamente después de la fusión sexual) (Worden 2009).

Se han definido tres especies distintas de algas prasinofíceas del género *Ostreococcus* con base en su adaptación gradual y decreciente a la intensidad de la luz: *O. lucimarinus*, *O. tauri* y *O. sp.*, respectivamente. Sus respectivos genomas fueron secuenciados (el genoma de *O. sp.* aun no ha sido analizado) con el fin de conocer como las diferencias en la estructura del genoma y sobre todo en las capacidades metabólicas, pueden contribuir a definir el nicho ecológico de cada alga (DOE JGI). La comparación de los genomas de las dos primeras especies, *O. tauri* (12.6 Mpb y 20 cromosomas) y *O. lucimarinus* (13.2 Mpb y 21 cromosomas), refleja procesos de adaptación y especiación. Ambas especies (1) han perdido genes que codifican factores de transcripción y proteínas de la pared celular y de la biosíntesis del flagelo; (2) presentan genes fusionados que participan en la biosíntesis de pigmentos y en la utilización de nitratos; y (3) tienen un sistema único de metilación/demetilación (i.e. metiltransferasas bacterianas

fusionadas a un dominio de cromatina) que probablemente está involucrado en la detección de DNA foráneo. En cuanto a la organización del genoma, el número de cromosomas varía, pero 18 cromosomas comparten un contenido y orden de genes similar. En cuanto al contenido de genes, se encontró que *O. lucimarinus* tiene un gran número de seleno-proteínas (*i. e.* residuos de celenocistéina) que probablemente participan en el metabolismo de metales esenciales (Palenik 2007).

Aun no se han secuenciado genomas nucleares de algas ulvofíceas, y de algas trebouxofíceas solamente se han secuenciado dos representantes: *Coccomyxa* sp. y *Chlorella* sp. Éstas tienen una forma de vida libre y de endosimbionte, respectivamente, por lo que se espera conocer cómo se reflejan estos estilos de vida a nivel genómico (Higashiyama 1991).

Hasta el momento solamente hay dos genomas totalmente secuenciados de algas clorofíceas, el de *C. reinhardtii* (Merchant 2007) y *Volvox carteri* (Prochnik 2010). El análisis del genoma nuclear de *C. reinhardtii* (127 Mpb y 17 cromosomas) reveló que aproximadamente la mitad de las proteínas que codifica tienen homólogos con humano y la planta *Arabidopsis thaliana*. El 10% de éstas corresponde a proteínas eucariontes de flagelo o de estructuras del cuerpo basal (centríolos y cilios); el 26% corresponde a proteínas de cloroplasto (estroma, pirenoide y tilacoides) o de organismos fotosintéticos. Por lo tanto, se especula que el genoma de *C. reinhardtii* comparte varias características con el último ancestro común de plantas y animales (Merchant 2007). *V. carteri* ha sido utilizado como un organismo modelo para el estudio de la transición de vida unicelular a multicelular (Herron 2009). Su ciclo reproductivo incluye pasos de embriogénesis muy similares al desarrollo embrionario de plantas y animales. Así, el genoma de *V. carteri* (138 Mpb y 14 cromosomas) se secuenció con el fin de obtener conocimiento a nivel genómico acerca de los factores involucrados en la transición de vida unicelular a multicelular.

El primer análisis del genoma de *V. carteri* sugiere que ocurrió una expansión en un grupo específico de proteínas involucradas en el ciclo celular, las ciclinas de tipo D. *V. carteri* tiene cinco ciclinas tipo D y sólo tres de ellas presentan ortólogos en *C. reinhardtii*. Esto probablemente constituyó un evento clave para la innovación de procesos relacionados con la proliferación celular (Prochnik 2010).

B) Genomas mitocondriales.

En total, se han secuenciado y anotado 16 genomas mitocondriales de algas verdes (Tabla 3). Éstos se han clasificado con base en el contenido y tipo de genes en “ancestrales” y “reducidos” (Turmel 1999). Los genomas de tipo ancestral tienen un tamaño de 44 a 95 kpb; contienen genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria, RNAs ribosomales y el juego completo de RNAs de transferencia (Nedelcu 2000). Los genes que codifican RNAs ribosomales están localizados de manera continua en el genoma mitocondrial. A este grupo pertenecen los genomas de las algas prasinofíceas, ulvofíceas, trebouxofíceas y (Turmel 1999).

Los genomas de tipo reducido tienen un tamaño de 12 a 28 kpb; contienen solamente algunos de los genes que codifican RNAs ribosomales, proteínas de la cadena respiratoria y RNAs de transferencia. Los genes que codifican los RNAs ribosomales están fragmentados y localizados de manera dispersa. A este grupo pertenecen los genomas de las algas clorofíceas *C. eugametos*, *C. reinhardtii*, *V. carteri*, *P. capuana*, *P. sp.* y el del alga pedinofícea *P. minor* (Turmel 1999).

Los genomas mitocondriales del alga prasinofícea *P. provasolii* y del alga clorofícea *S. obliquus* presentan características de ambos tipos de genomas. Por ejemplo, el genoma mitocondrial de *P. provasolii* no contiene el juego completo de tRNAs y algunos de los genes que los codifican están fragmentados. También, tiene un tamaño semejante al de los genomas de tipo reducido. Sin embargo, éste contiene la mayoría de los genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria, al igual que los genomas de tipo ancestral. En el caso del genoma mitocondrial de *S. obliquus*, éste contiene algunos genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria y los genes que codifican rRNA están fragmentados y localizados de manera dispersa, como en los genomas de tipo reducido. No obstante, su tamaño es semejante al de los genomas de tipo ancestral (Nedelcu 2000).

Tabla 3. Genomas secuenciados de algas clorofitas. El genoma nuclear total de los taxa presentes en el TBestDB no se ha secuenciado, pero hay bibliotecas de secuencias expresadas disponibles. Todos los genomas de cloroplasto tienen una estructura circular. P, *Prasinophyceae*; U, *Ulvoophyceae*; T, *Trebouxiophyceae*; C, *Chlorophyceae*; Pe, *Pedinophyceae*. DOE Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/>), TBestDB (<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/searches/welcome.php>), Yale University (http://www.eng.yale.edu/peccialab/microalgae_sequences.html). Los números de acceso son del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Taxa	Clase	Genoma nuclear	Genoma mitocondrial			Genoma de cloroplasto	
		Consorcio	Número de acceso	Estructura	Tamaño (kpb)	Número de acceso	Tamaño (kpb)
<i>Micromonas pusilla</i>	P	DOE Joint Genome Institute	-	-	-	NC_012568	41
<i>Micromonas</i> sp.	P	DOE Joint Genome Institute	NC_012643	Circular	47	NC_012575	72
<i>Monomastix</i> sp.	P	-	-	-	-	NC_012101	114
<i>Nephroselmis olivacea</i>	P	TBestDB	NC_008239	Circular	45	NC_000927	200
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	P	DOE Joint Genome Institute	-	-	-	-	-
<i>Ostreococcus</i> sp.	P	DOE Joint Genome Institute	-	-	-	NC_008289	71
<i>Ostreococcus tauri</i>	P	DOE Joint Genome Institute	NC_008290	Circular	44	-	-
<i>Pycnococcus provasolii</i>	P	-	NC_013935	Circular	24	NC_012097	80
<i>Pyramimonas parkeae</i>	P	-	-	-	-	NC_012099	101
<i>Acetabularia acetabulum</i>	U	TBestDB	-	-	-	-	-
<i>Bryopsis hypnoides</i>	U	-	-	-	-	NC_013359	153
<i>Oltmansiellopsis viridis</i>	U	-	NC_008256	Circular	56	NC_008099	151
<i>Pseudendoclonium akinetum</i>	U	-	NC_005926	Circular	95	NC_008114	195
<i>Botryococcus braunii</i>	T	DOE Joint Genome Institute	-	-	-	-	-
<i>Coccomyxa</i> sp.	T	DOE Joint Genome Institute	NC_015316	Circular	65	NC_015084	175
<i>Chlorella</i> sp.	T	DOE Joint Genome Institute	-	-	-	-	-
<i>Chlorella variabilis</i>	T	-	-	-	-	NC_015359	124
<i>Chlorella vulgaris</i>	T	-	-	-	-	NC_001865	150
<i>Helicosporidium</i> sp.	T	TBestDB	-	-	-	NC_008100**	37
<i>Leptosira terrestris</i>	T	-	-	-	-	NC_009681	195
<i>Oocystis solitaria</i>	T	-	-	-	-	-	-

<i>Parachlorella kessleri</i>	T	-	-	-	-	NC_012978	123
<i>Prototheca wickerhamii</i>	T	TBestDB	NC_001613	Circular	55	-	-
<i>Chlamydomonas eugametos</i>	C	-	NC_001872	Circular	22	-	-
<i>Chlamydomonas incerta</i>	C	TBestDB	-	-	-	-	-
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	C	Aberystwyth University*	-	-	-	-	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	C	DOE Joint Genome Institute	NC_001638	Lineal: 1 cromosoma	15	NC_005353	203
<i>Dunaliella salina</i>	C	DOE Joint Genome Institute	NC_012930	Circular	28	-	-
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	C	Yale University	-	-	-	-	-
<i>Floydiella terrestris</i>	C	-	-	-	-	NC_014346	521
<i>Oedogonium cardiacum</i>	C	-	-	-	-	NC_011031	196
<i>Polytomella capuana</i>	C	-	NC_010357	Lineal: 1 cromosoma	12	-	-
<i>Polytomella parva</i>	C	TBestDB	-	Lineal: 2 cromosomas	13.5 y 3.5	-	-
<i>Polytomella sp.</i>	C	-	NC_013472**	Lineal: 2 cromosomas	13 y 3	-	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	C	TBestDB	NC_002254	Circular	42	NC_008101	161
<i>Stigeoclonium helveticum</i>	C	-	-	-	-	NC_008372	223
<i>Volvox carteri</i>	C	DOE Joint Genome Institute	Smith 2009	Lineal: 1 cromosoma	30	-	420
<i>Pedinomonas minor</i>	Pe	-	NC_000892	Circular	25	-	-

*Secuencia no disponible.

**Incompletos.

C) Genomas de cloroplasto.

Se han secuenciado 22 genomas de cloroplasto de algas verdes (Tabla 3). Los genomas de cloroplasto se han clasificado con base en la organización de genes y en la dirección en que se transcriben. Éstos se dividen en cuatro regiones: dos secuencias palindrómicas invertidas repetidas que contienen los genes que codifican los rRNAs; y dos regiones, una corta y una larga, que contienen copias únicas de genes y se denominan SSC y LSC, respectivamente (por sus siglas en inglés Small Single-Copy y Large Single-Copy, respectivamente). La disposición más común es una estructura cuatripartita que consiste en que las secuencias palindrómicas invertidas repetidas están separadas entre sí por las regiones SSC y LSC, y los genes que codifican los rRNAs se transcriben en dirección hacia la región SSC (Turmel 1999b). El genoma de los cloroplastos de los miembros del phylum *Streptophyta*, de las prasinofíceas, de las pedinofíceas y de algunas trebouxofíceas presentan dicha organización (Belanger 2006, Turmel 2009b). El genoma de cloroplasto de la trebouxofícea *C. vulgaris* presenta una estructura tripartita que carece de la secuencia repetida invertida (Belanger 2006). En cambio, en el genoma de cloroplasto de las ulvofíceas la estructura cuatripartita está conservada, pero los genes que codifican los rRNAs se transcriben en dirección opuesta a la región SSC (Pombert 2005 y 2006). Finalmente, los genomas de cloroplasto de las clorofíceas presentan una gran diversidad. Los genomas de *S. obliquus* y *C. reinhardtii* tienen regiones de copias únicas de genes de longitud similar. Además, el contenido de genes de estas regiones es muy variable, lo cual se atribuye a eventos de recombinación entre éstas (Maul 2002, de Cambiaire 2006). El genoma de *O. cardiacum* presenta la misma estructura que los dos genomas de cloroplasto anteriores, pero el contenido de genes de cada una de las regiones es diferente (Brouard 2008). El genoma de *S. helveticum* no tiene secuencias palindrómicas invertidas repetidas (Belanger 2006).

Genes fragmentados: el caso de *cox2*

Los genomas mitocondriales de cada grupo particular de organismos han evolucionado de manera distinta. La gran diversidad a nivel estructural y en contenido de genes es principalmente el resultado de una reducción gradual del genoma del endosimbionte original (*i.e.* ancestro de las α -proteobacterias) que ocurrió durante las etapas tempranas de su establecimiento como organelo celular. Los genes que no eran esenciales o que tenían una función redundante en el hospedero se perdieron (Gray 1999, Timmis 2009).

Los genomas mitocondriales contienen genes que codifican rRNAs, tRNAs y proteínas de los distintos complejos enzimáticos de la cadena respiratoria (Timmis 2009). Esta última está constituida por complejos proteicos membranales que están asociados a diversos grupos prostéticos redox. Estos complejos transportan los electrones desde los sustratos oxidables (NADH y succinato) hasta el oxígeno. En organismos eucariontes, el complejo I o NADH deshidrogenasa tiene 34 subunidades, utiliza como sustrato al NADH y

transfiere los electrones a la poza de quinonas. El complejo II o succinato deshidrogenasa tiene cinco subunidades, utiliza como sustrato succinato y también transfiere los electrones a la poza de quinonas. Además, ésta es la única enzima que participa en el ciclo de Krebs y que es membranal. El complejo III o complejo *bc1* está formado por 10 u 11 subunidades, según el organismo, y cataliza la oxidación de quinol y la reducción de citocromo *c* mediada por un ciclo Q protón-motriz. El complejo IV o citocromo *c* oxidasa está constituido por 10 o 13 subunidades y cataliza la transferencia de electrones del ferricitocromo *c* hasta el oxígeno. Finalmente, el complejo V o F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial utiliza el gradiente electroquímico generado por la cadena respiratoria para sintetizar ATP utilizando como aceptor de electrones final al oxígeno (Nelson DL 2004).

Los genes mitocondriales que se relocalizan exitosamente en el genoma nuclear experimentan cambios debido a las diferencias que existen en la maquinaria transcripcional y traduccional de los respectivos compartimentos celulares. Los cambios incluyen la adquisición de un promotor, una señal de poliadenilación, una presecuencia de localización mitocondrial y en algunos casos, intrones procesadores (llamados “spliceosomal introns” en inglés). Hay solamente dos genes que codifican para componentes de la cadena respiratoria que están presentes universalmente en el genoma mitocondrial: *cob* (complejo III) y *cox1* (complejo IV). Además, en aquellos organismos que expresan complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa), también están presente los genes *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L* y *nad5*. La característica principal de las proteínas codificadas por estos genes es que son sumamente hidrofóbicas debido a que presentan varios cruces transmembranales (de 8 a 16) (Adams 2003). Además, en el caso de las algas verdes, todos los genes que codifican proteínas del complejo II están ausentes en los genoma mitocondriales secuenciados (Tabla 4).

Normalmente, los genes que están ausentes en el genoma mitocondrial se encuentran como un solo gen en el genoma nuclear (Adams 1999, Pérez-Martínez 2002, Funes 2002). No obstante, existen casos en que los genes que están ausentes en el genoma mitocondrial se encuentran como genes fragmentados en el genoma nuclear (Adams 2001, Gawryluk 2009, Gawryluk 2010) (Ambos casos se tratan ampliamente en la sección de Discusión). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio describieron que en las algas clorofíceas *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp. y *S. obliquus* el gen *cox2* que codifica la subunidad dos (*i.e.* COXII) del complejo IV o citocromo *c* oxidasa está fragmentado en dos genes: *cox2a* y *cox2b* (Pérez-Martínez 2001, Funes 2002b) (Tabla 4). Hasta el momento, todos los genomas mitocondriales secuenciados contienen el gen *cox2*, a excepción de las algas verdes mencionadas y de un grupo de organismos del phylum *Apicomplexa* (Funes 2002b). Además, este gen normalmente codifica un solo polipéptido, la subunidad COXII, que es parte del núcleo catalítico del complejo IV (Figuras 5 y 6).

Tabla 4. Genes mitocondriales que codifican proteínas de los complejos I, IV y V de la cadena respiratoria. P, *Prasinophyceae*; U, *Ulvophyceae*; T, *Trebouxiophyceae*; C, *Chlorophyceae*; Pe, *Pedinophyceae*.

Gen mitocondrial	P				U		T		Pe	C					
	<i>N. olivacea</i>	<i>O. tauri</i>	<i>Micromonas</i> sp.	<i>P. provasolii</i>	<i>O. viridis</i>	<i>P. akinetum</i>	<i>Coccomyxa</i> sp.	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. minor</i>	<i>S. obliquus</i>	<i>C. eugametos</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>D. salina</i>	<i>P. capuana</i>	<i>V. carteri</i>
Complejo I															
<i>nad1</i>	+	+	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>nad4</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad4L</i>	+	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>nad5</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad6</i>	+	+	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad7</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>nad9</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>nad10</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Complejo IV															
<i>cox1</i>	+	+*	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cox2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+**	-	-	-	-	-
<i>cox3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Complejo V															
<i>atp1</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>atp4</i>	+	+	+*	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>atp6</i>	+	+	+*	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>atp8</i>	+	+*	+*	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>atp9</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

*Genes duplicados.

**Fragmento de gen. Datos obtenidos para el caso de *V. carteri* de Smith *et al.* (Smith 2009) y el resto del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome.cgi?taxid=2759&hopt=html>).

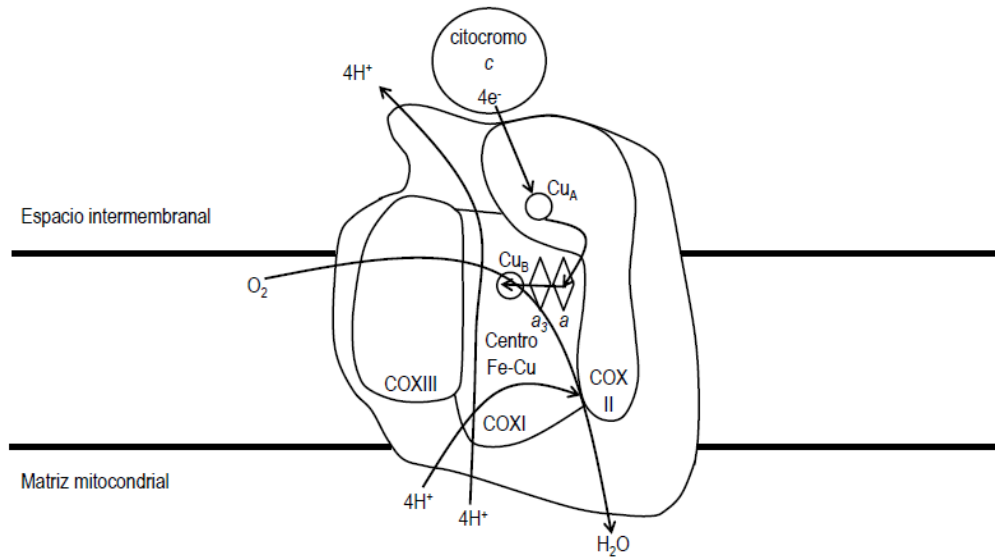


Figura 5. Complejo IV o citocromo c oxidasa (modificado de Nelson DL 2004). La citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1) es la última enzima de la cadena respiratoria. En la figura se indican las tres subunidades que son críticas para el flujo de electrones (e^-): COXI, COXII y COXIII. La estructura que engloba a las tres subunidades representa a las subunidades accesorias. El flujo de electrones comienza cuando dos moléculas de citocromo c donan, cada una, un electrón al centro binuclear Cu_A . Los electrones pasan del sitio hemo a al centro Fe-Cu (incluye el sitio hemo a_3 y el sitio de unión a cobre Cu_B), en donde el oxígeno (O_2) es reducido por dos electrones. Los electrones provenientes de la segunda molécula de citocromo c se unen al oxígeno y generan agua (H_2O), consumiendo cuatro protones (H^+) de la matriz mitocondrial. Al mismo tiempo cuatro protones son bombeados al espacio intermembranal.

En *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. los genes *cox2a* y *cox2b* se localizan en el genoma nuclear. En el caso de *S. obliquus* el gen *cox2b* se localiza en el genoma nuclear mientras que el gen *cox2a* se localiza en el genoma mitocondrial (Pérez-Martínez 2001, Funes 2002b, Nedelcu 2000). El gen *cox2a* codifica el polipéptido COXIIA que contiene dos cruces transmembranales y el sitio de unión al citocromo c, y que corresponde a la porción amino terminal de la proteína COXII ortodoxa. También, el gen *cox2a* codifica una presecuencia de localización mitocondrial denominada MTS por las siglas en inglés de Mitochondrial Targeting Sequence, que no forma parte de la secuencia madura de COXIIA. El gen *cox2b* codifica el polipéptido COXIIB que contiene el sitio de unión a cobre y que corresponde a la porción carboxilo terminal de la proteína COXII ortodoxa. Ambas proteínas tienen características fisicoquímicas, como una menor hidrofobicidad, que les permiten ser importadas a la mitocondria. Los polipéptidos COXIIA y COXIIB presentan secuencias únicas de aproximadamente 20 a 40 aminoácidos en los extremos carboxilo y amino terminales, respectivamente. Se ha propuesto que los polipéptidos COXIIA y COXIIB interactúan entre sí a través de las extensiones para conformar la proteína COXII ortodoxa (Pérez-Martínez 2001) (Figura 6).

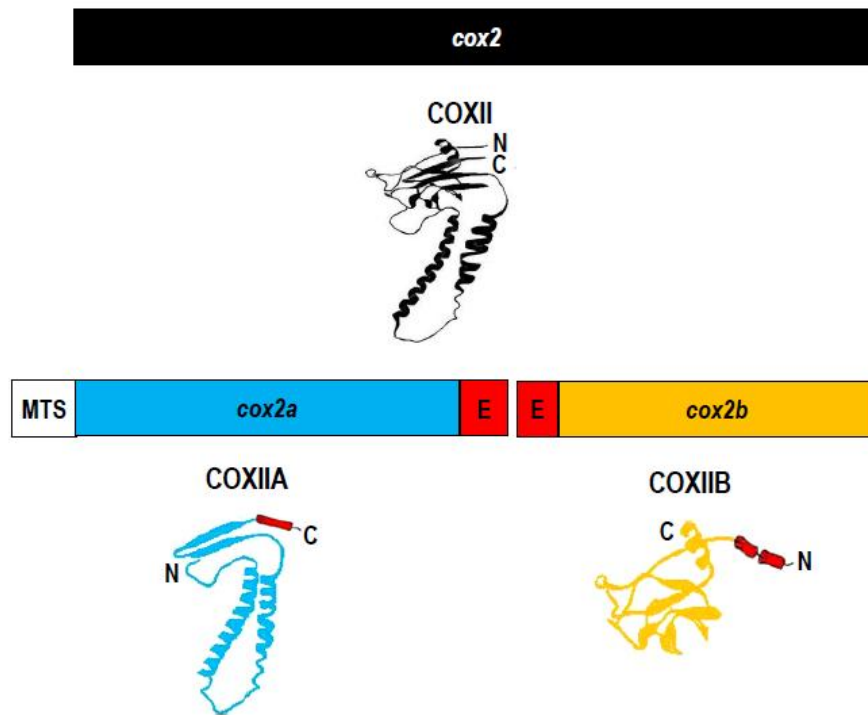


Figura 6. Genes y proteínas (modificado de Pérez-Martínez 2001). Representación conceptual de los genes *cox2* (negro), *cox2a* (azul) y *cox2b* (amarillo) y del polipéptido que codifican, incluyendo su estructura terciaria. N, extremo amino terminal. C, extremo carboxilo terminal. MTS, presecuencia de localización mitocondrial por sus siglas en inglés de Mitochondrial Targeting Sequence. E, extensiones (rojo).

Genes nuevos: el caso de las ASAs

El complejo V o F_1F_0 - ATP sintasa mitocondrial está constituida por dos porciones: una hidrofílica denominada F_1 y una hidrofóbica denominada F_0 . La ATP sintasa es un motor molecular constituido por tres partes: (1) un rotor compuesto por las subunidades γ , δ , ϵ y c_{10} que rotan sobre un eje perpendicular al plano de la membrana; (2) un estator compuesto por las subunidades a , A6L, e , f , g , b_2 , OSCP, F6; y (3) un centro catalítico que también es parte del estator y que está compuesto por tres subunidades α y tres subunidades β (Walker 2006). Estudios previos en el laboratorio describieron que la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. contiene un estator atípico. El estator tiene las subunidades clásicas a y OSCP, pero además presenta nueve subunidades denominadas ASA (por sus siglas en inglés ATPase Synthase-Associated). Los genes que las codifican se localizan en el genoma nuclear, se denominan ASA 1 a 9 y no presentan homólogos en las bases de datos (Vázquez-Acevedo 2006, Cano-Estrada 2010) (Figura 7).

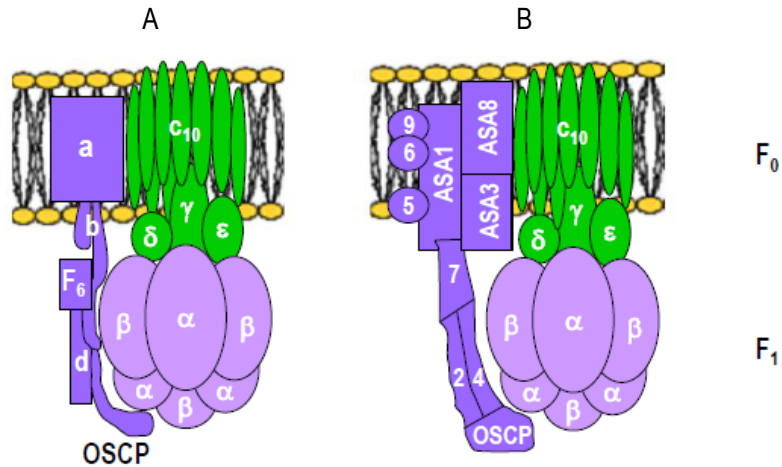


Figura 7. Composiciones diferentes del estator del Complejo V o ATP sintasa (Cano-Estrada 2010). La ATP sintasa (EC 3.6.3.14) sintetiza ATP a partir del gradiente quimiosmótico generado a través de la membrana por el flujo de electrones a través de los diferentes complejos de la cadena respiratoria. El rotor (verde) está compuesto por las subunidades *c* que forman un anillo embebido en la membrana mitocondrial y que unen a las subunidades *e*, *d* y *g*. Asimismo, estas últimas unen a las tres subunidades α y β que conforman el centro catalítico de la enzima (lila). La subunidad transmembranal *a* une dos subunidades *b* que conforman un brazo que mantienen fijo al centro catalítico, denominado estator (morado). El estator está constituido normalmente por las subunidades *b*, OSCP, F6 y *d* (Figura 7 A). Dependiendo del organismo, puede haber más subunidades asociadas a la subunidad *a* (i.e. A6L, *e*, *f*, *g*). En el caso de la ATP sintasa de *Polytomella* sp. solamente las subunidades *a* y OSCP del estator están conservadas y en lugar de las demás subunidades se encuentran las subunidades ASA (Figura 7 B).

Planteamiento del problema

La gran diversidad que presentan las algas clorofíceas probablemente sea reflejo de una intrincada historia evolutiva. Los criterios tradicionalmente utilizados por la sistemática no han sido concluyentes, resultando en diversas filogenias que están en constante revisión. Así, el nuevo panorama (e.g. estructura, composición, organización y contenido de genes) que provee la genómica constituye una herramienta confiable para determinar y analizar diferencias informativas que no son observables a nivel macroscópico. Tanto la fragmentación de genes como la adquisición exitosa de genes nuevos son eventos moleculares relativamente raros que tienen implicaciones importantes a nivel molecular, celular, metabólico y evolutivo. La fragmentación del gen *cox2* y la presencia de genes que codifican subunidades ASA, constituyen características que hasta la fecha son exclusivas de algas verdes, específicamente de la clase *Chlorophyceae*. Con base en esto proponemos las siguientes hipótesis.

Hipótesis

- La fragmentación del gen *cox2* ocurrió una sola vez durante la historia evolutiva de las algas clorofitas.
- Los linajes de algas emparentadas a *Chlamydomonas reinhardtii* tendrán genes *cox2* fragmentados.
- Aquellas algas que tienen el gen *cox2* fragmentado también tienen subunidades ASA.

Objetivos

- Determinar si el gen *cox2* está intacto o fragmentado en las algas clorofíceas seleccionadas.
- Determinar si los genes *cox2*, *cox2a* y *cox2b* se localizan en el genoma mitocondrial o nuclear, y como se distribuyen en las diferentes algas verdes.
- Buscar la presencia de subunidades ASA o de sus genes correspondientes en algas clorofíceas.

Materiales y Métodos

Algas

Se seleccionaron aislados representativos de las diferentes clases de algas clorofitas (Tabla 5). El criterio que se siguió fue elegir por lo menos un aislado de cada una de las siguientes clases: *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae*. En el caso de la clase *Pedinophyceae* y del orden Chaetopeltidales, no se pudieron conseguir aislados. Los representantes de la clase *Chlorophyceae* se eligieron con base en la filogenia más representativa en ese momento, la de Pröschold *et al.* (Pröschold 2001). Los aislados seleccionados fueron representativos de por lo menos tres de los cinco órdenes de clorofíceas: Chlamydomonadales, Sphaeropleales y Chaetophorales.

Tabla 5. Aislados de algas clorofitas utilizados.

Clase	Taxa	Aislado
<i>Prasinophyceae</i>	<i>Micromonas pusilla</i>	UTEX 991
	<i>Tetraselmis gracilis</i>	UTEX 2563
<i>Ulvophyceae</i>	<i>Pseudendoclonium akinetum</i>	UTEX 1912
<i>Trebouxiophyceae</i>	<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1533
	<i>Pseudotrebouxia impressa</i>	UTEX 892
<i>Chlorophyceae</i>	Orden: Chlamydomonadales	
	<i>Chlamydomonas applanata</i>	UTEX 225
	<i>Chlamydomonas monadina</i>	UTEX 210
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	UTEX 1062
	<i>Characium saccatum</i>	UTEX 111
	<i>Dunaliella parva</i>	UTEX 1983
	<i>Dunaliella</i> sp.	UTEX SP16
	<i>Hormotila blennista</i>	UTEX 1239
	<i>Tetracystis aeria</i>	UTEX 1453
	Orden: Sphaeropleales	
	<i>Podohedriella falcata</i>	UTEX 101
	<i>Bracteacoccus aerius</i>	UTEX 1250
	<i>Bracteacoccus grandis</i>	UTEX 1246
	<i>Bracteacoccus</i> sp.	UTEX 2252
	<i>Characium hindakii</i>	UTEX 2098
	<i>Neochloris aquatica</i>	UTEX 138
	<i>Planktosphaeria texensis</i>	UTEX 1241
	<i>Pseudomuriella schumacherensis</i>	SAG 2137
	Orden: Chaetophorales	
	<i>Chaetophora incrassata</i>	UTEX 1289
	<i>Stigeoclonium helveticum</i>	UTEX 441

Otros aspectos que se tomaron en cuenta fueron la disponibilidad de los aislados, que se pudieran mantener en cultivo en el laboratorio y que preferentemente fueran axénicos. Todos los aislados se obtuvieron de la colección UTEX de la Universidad de Texas, excepto *P. schumacherensis* que se obtuvo de la colección

SAG de la Universidad de Göttingen. Los aislados se crecieron en los medios recomendados y se mantuvieron a 20° C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

También, se contó con bibliotecas de cDNA de *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp. y *S. obliquus* previamente obtenidas en el laboratorio.

Microscopía

Normalmente, las algas verdes crecen en simbiosis con otras algas u hongos. Por lo tanto, para determinar que los cultivos estuvieran libres de contaminantes, se tomó una muestra de cada cultivo, se observaron al microscopio CX31 Olympus (Olympus Corporation of the Americas, USA). Se tomaron fotos de los cultivos con el software Cellsens Digital Imaging.

Purificación de DNA

El DNA de los aislados se obtuvo con los kits PowerPlant DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA) y DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del DNA se determinó espectrofotométricamente en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Diseño de oligonucleótidos

A) *cox2*

Se diseñaron oligonucleótidos degenerados basándose en las secuencias del gen *cox2* y de los genes *cox2a* y *cox2b* que había publicados en el momento: *cox2* de *P. akinetum* (*Ulvophyceae*) y de *P. wickerhamii* (*Trebouxiophyceae*); y *cox2a* y *cox2b* de *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp. y *S. obliquus* (*Chlorophyceae*) (Tabla 8). Se seleccionaron regiones conservadas con secuencias consenso de aminoácidos (Figura 8 y Tabla 6). Asimismo, se consideró la preferencia por el uso de codones mitocondrial y nuclear que estaba publicado para las siguientes clorofitas: *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp., *S. obliquus*, *Dunaliella* sp., *Chloromonas* sp. (*Chlorophyceae*) y *Tetraselmis* sp. (*Prasinophyceae*) (Kazusa database: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Tabla 6. Oligonucleótidos para *cox2*. M, mitocondrial; N, nuclear. Las bases degeneradas están indicadas por el código de IUPAC.

Gen	Uso de codones	Dirección	Secuencia de amino ácidos	Secuencia de DNA (orientación 5' a 3')
<i>cox2</i>	M	Delantero	GHQWYWSYE	GGWCAYCARTGGTAYTGGAGYTAYG
	M	Reverso	FYGQCSELCG	CCACAYAAYTCACTACATTGWCCRTARAAAAC
	N	Delantero	GHQWYWSYE	GGCCACCAGTGGTACTGGWCTACGAG
	N	Reverso	FYGQCSELCG	CCCGCASAGCTCGGAGCACTGGCCGTAG
<i>cox2a</i>	M	Delantero	DLHHDIFFFL	GATTTTCAYCAYGATATTTTTYTTYTTRTTG
	M	Reverso	GHQWYWSYE	TCRTARCTCCARTACCACTGRTGWCC
	N	Delantero	DLHHDIFFFL	GACCTSCACCACGACATCTTCTTCTCC
	N	Reverso	GHQWYWSYE	CTCGTAGGACCAGTACCACTGGTGCC
<i>cox2b</i>	M	Delantero	RLLEVDNRVV	CGTTTTTRGARGTTGATAAYCGTGTTG
	M	Reverso	FYGQCSELCG	CCACAYAAYTCACTACATTGWCCRTARAAAAC
	N	Delantero	RLLEVDNRVV	CGCCTSGAGGTSGACGAGCGCCTSG
	N	Reverso	FYGQCSELCG	CCCGCASAGCTCGGAGCACTGGCCGTAG

B) Extensión N-terminal de *S. obliquus*

Se diseñó un oligonucleótido delantero con tres segmentos, en dirección 5' a 3': un sitio *EcoRI*, 17 nucleótidos complementarios a una porción del genoma del fago filamentoso M13 y 20 bases aleatorias. Este oligonucleótido se denominó oligonucleótido aleatorio y su secuencia es: 5' GGAATTCGTAAAACGACGGCCAGT + 20 N's. También se utilizaron el oligonucleótido correspondiente al gen *cox2b* nuclear reverso (Tabla 6) y el oligonucleótido comercial reverso para M13 de Invitrogen (Invitrogen, Life Technologies Co., USA) 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'.

C) *asa8*

Se diseñaron oligonucleótidos basándose en la secuencia del polipéptido ASA 8 de las algas clorofíceas *C. reinhardtii* (EDP01930), *Polytomella* sp. (ADH59420) y *V. carteri* (JGI scaffold_5: 572033-572281): oligonucleótido delantero 5' CTGGGCGAGGCCTACCTGAAGGACATCCTGCG 3' y oligonucleótido reverso 5' GCCGGCCAGCACGGCCTCGTCGTAGGCC 3'. Se seleccionaron regiones conservadas con secuencias consenso de aminoácidos (Figura 12). Asimismo, se consideró la preferencia por el uso de codones nuclear de cada alga clorofícea.

Amplificación de DNA genómico total

Cada reacción de PCR se hizo en un volumen final de 50 μ l. Se empleó 1X de buffer de Taq Accuzyme (Bioline USA Inc.), 2 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTP's, 0.5 U de polimerasa termoestable Accuzyme (Bioline USA Inc.). La cantidad de DNA que se utilizó como templado se especifica a continuación, para cada caso.

A) *cox2*

Los fragmentos de DNA correspondientes a los genes *cox2*, *cox2a* y *cox2b* se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la Taq polimerasa Accuzyme (Bioline USA Inc.). Se utilizaron aproximadamente de 60 a 200 ng de DNA por reacción. Todos los DNAs fueron preincubados a 94°C durante cinco minutos antes de cada reacción debido al alto porcentaje de GC (entre 34% y 57% (Smith 2009)). Las condiciones de amplificación para los fragmentos fueron las siguientes:

- *cox2* mitocondrial: 40 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos a 48°C y 40 segundos a 72°C.
- *cox2a* mitocondrial*: 30 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos a 53°C y 1 minuto a 72°C.
- *cox2a* nuclear: 30 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos a 51°C y un minuto a 72°C.
- *cox2b* mitocondrial y nuclear: 30 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos a 60°C y 30 segundos a 72°C.

Todas las reacciones de incluyeron un paso final a 72°C durante 10 minutos. En el caso de la amplificación del fragmento de *cox2* nuclear se llevaron a cabo dos reacciones de PCR. La primera se utilizó como templado DNA total y en la segunda se utilizaron 10 µl de la primera reacción como templado.

B) Extensión N-terminal de *S. obliquus*

Para amplificar la extensión de *S. obliquus* se siguió una estrategia que consistió en reacciones de PCR anidadas. Para la primera ronda de PCRs se utilizó el oligonucleótido aleatorio delantero y el oligonucleótido reverso correspondiente al gen *cox2b* nuclear. En esta primera ronda el objetivo fue amplificar un fragmento de DNA que comprendiera el gen *cox2b* completo de *S. obliquus* (i.e. que incluyera la extensión N-terminal). Se utilizó como templado DNA total de *S. obliquus*, aproximadamente 100 ng, que fue preincubado a 94°C durante cinco minutos debido al alto porcentaje de GC. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 20 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos a 60°C y 2 minutos a 72°C, y 10 minutos a 72°C. La reacción resultante de PCR se purificó con el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. En la segunda ronda se utilizó el oligonucleótido delantero de M13 y el oligonucleótido reverso correspondiente al gen *cox2b* nuclear. En esta segunda ronda el objetivo fue amplificar específicamente el gen *cox2b* nuclear de *S. obliquus* incluyendo su extensión N-terminal, utilizando como templado los fragmentos previamente amplificados que comprenden el gen *cox2b*. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos a 60°C y 1 minuto a 72°C, y 10 minutos a 72°C. Se utilizó como templado la primera reacción de PCR (10 µl). Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observaron dos bandas muy intensas con un tamaño aproximado de 450 pb y 900 que fueron clonadas y secuenciadas.

C) *asa8*

Los fragmentos de DNA correspondientes al gen *asa8* se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la Taq polimerasa Accuzyme (Bioline USA Inc.). Se utilizaron aproximadamente de 60 a 200 ng de DNA por reacción. Todos los DNAs fueron preincubados a 94°C durante cinco minutos antes de cada reacción debido al alto porcentaje de GC. Las condiciones de amplificación para los fragmentos fueron las siguientes: 30 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos a 57°C y 1 minuto a 72°C, y 10 minutos a 72°C.

Clonación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con el sistema QIAquick gel extraction kit (QIAGEN Inc., USA) y posteriormente fueron clonados de manera independiente en el vector pGEM-T Easy Vector System (Promega Co., USA). Todos los fragmentos se secuenciaron utilizando el oligonucleótido universal -20 M13. Las secuencias obtenidas para *cox2*, *cox2a*, *cox2b* y 18S se depositaron en el GenBank. Los números de acceso se indican en la Tabla 8.

Análisis *in silico*

A) BLASTs

Se llevaron a cabo análisis tipo BLAST utilizando como secuencias pregunta proteínas y comparando contra bases de datos de proteína (blastp) o de nucleótidos traducidos (tblastn). Las secuencias pregunta incluyeron: COXII, COXIIA, COXIIB (Tabla 8) y las ASAs 1 a 9 de *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. previamente reportadas (Vázquez-Acevedo 2006). Las bases de datos incluyeron: GenBank, Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/>) y TBestDB (<http://amoebidia.bcm.umontreal.ca/pepdb/searches/welcome.php>).

También se buscó directamente en la base de datos del GenBank las secuencias correspondientes a 18S de los aislados seleccionados de algas clorofitas (Tabla 6).

B) Análisis de secuencias

- La secuencia de DNA de cada producto de PCR clonado se tradujo utilizando el programa ExPASy Translate Tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).
- Se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Se incluyeron las secuencias de aminoácidos de todos los productos de PCR obtenidos y de las secuencias obtenidas mediante análisis tipo BLAST.
- Las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR obtenidos se analizaron con el programa AUGUSTUS (<http://augustus.gobics.de/>) para determinar la presencia de intrones.

- La predicción de localización intracelular del fragmento de *O. tauri* se realizó con el programa TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).
- Las frecuencias relativas de los cuatro nucleótidos en la primera, segunda y tercera posición correspondientes a *cox2a* y *cox2b* se determinaron para cada secuencia utilizando el programa MEGA (<http://www.megasoftware.net/>). La frecuencia de nucleótidos en la tercera posición se graficó contra cada nucleótido utilizando Microsoft Excel (Figura 16).

Análisis filogenético

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a los fragmentos de (1) MTS, (2) COXIIA, (3) COXIIB, y (4) COXIIA concatenado con COXIIB, se alinearon por separado con el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). COXIIA, COXIIB y COXIIA concatenado con COXIIB se alinearon con su contraparte correspondiente a COXII. Los alineamientos fueron corregidos manualmente utilizando el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/>).

El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>). Se utilizaron cuatro métodos para inferir relaciones filogenéticas: máxima verosimilitud (ML), máxima parsimonia (MP), evolución mínima (ME) y neighbor-joining (NJ). Se seleccionó (1) la matriz de Whelan y Goldman (WAG) y se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias en la tasa evolutiva entre sitios [cinco categorías (+G, parámetro = 7.4310); ó (2) el modelo de Jones-Taylor-Thornton de sustitución de aminoácidos junto con una distribución discreta Gamma con cinco categorías (JTT+G). El parámetro gamma de forma se estimó directamente a partir de los datos con MEGA5. El valor de confianza para las ramas internas utilizando los métodos de ML, MP, ME y NJ se obtuvo mediante análisis de bootstrap (500 réplicas).

Resultados

Cultivos

Los aislados seleccionados se crecieron exitosamente. Con el fin de verificar la morfología de cada aislado y que no tuvieran contaminantes (*i.e.* bacterias, hongos, protozoarios, etc.), se tomaron muestras de cada cultivo y se observaron al microscopio. En la Figura 8 se muestran las imágenes de algunos aislados representativos.

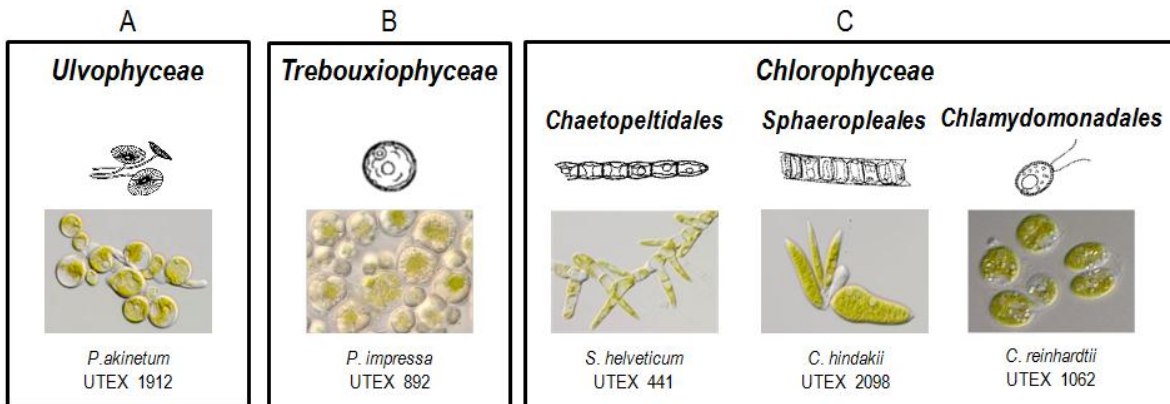


Figura 8. Microscopía de algas clorofitas. Aislados representativos de las clases *Ulvophyceae* (A), *Trebouxiophyceae* (B) y *Chlorophyceae* (C). Se muestran imágenes de los órdenes de las algas clorofíceas: Chaetophorales, Sphaeropleales y Chlamydomonadales.

Identificación del gen *cox2* ortodoxo o fragmentado en algas clorofitas

Para determinar si el gen *cox2* está intacto o fragmentado en las algas clorofitas seleccionadas se llevaron a cabo ensayos de PCR. La estrategia se basó en la división conceptual de los polipéptidos COXII, COXIIA y COXIIB (Figura 9).

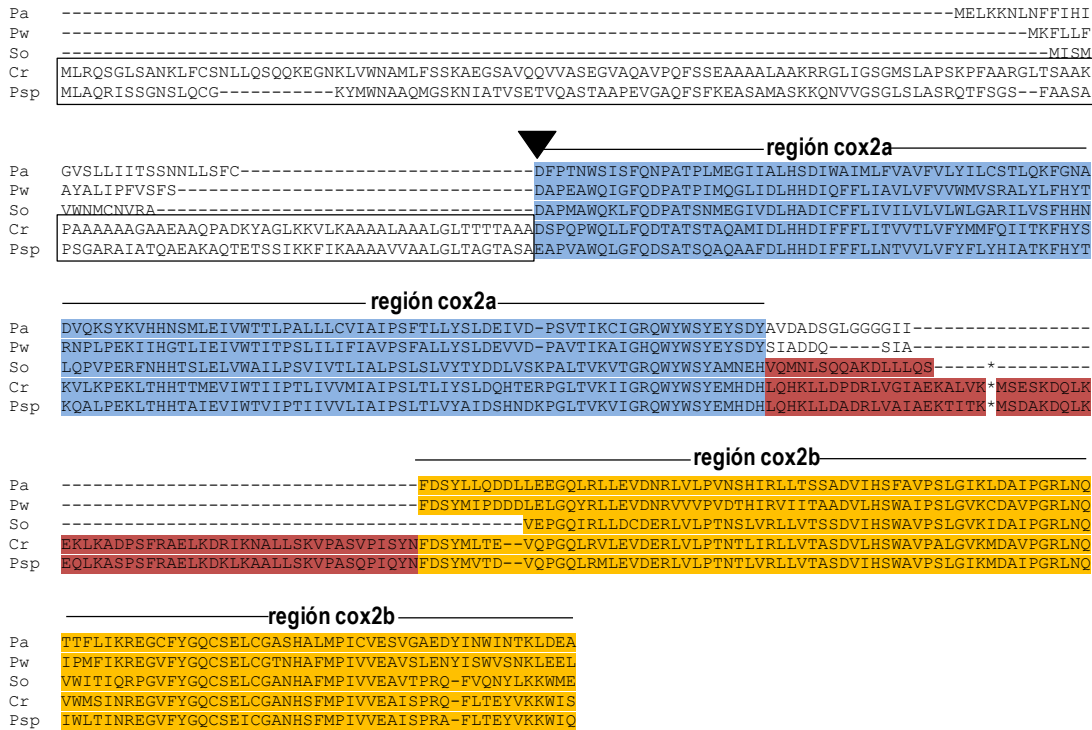


Figura 9. Comparación de secuencias de los polipéptidos COXII, COXIIA y COXII B (modificado de Pérez-Martínez 2001). Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos COXII de *P. akinetum* y *P. wickerhamii*, con los polipéptidos COXIIA y COXII B de *S. obliquus*, *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. Los polipéptidos COXIIA y COXII B se muestran contiguos por razones conceptuales. Las regiones principales se indican con colores: región cox2a en azul, región cox2b en amarillo y las extensiones amino y carboxilo terminales en rojo. La presecuencia de localización mitocondrial (MTS) de COXIIA está enmarcada. El triángulo negro indica el inicio de la secuencia madura de los polipéptidos COXII y COXIIA. Los asteriscos indican el final del polipéptido COXIIA maduro. Pa, *P. akinetum*; Pw, *P. wickerhamii*; So, *S. obliquus*; Cr, *C. reinhardtii*; Psp, *Polytomella* sp.

El polipéptido COXII codificado por el gen *cox2* se dividió en la región *cox2a* y la región *cox2b*. El polipéptido COXIIA codificado por el gen *cox2a* se dividió en presecuencia de localización mitocondrial (MTS), región *cox2a* y extensión. El polipéptido COXII B codificado por el gen *cox2b* se dividió en extensión y región *cox2b*. De tal manera, la estrategia consistió en que si el gen *cox2* es ortodoxo entonces se puede amplificar un fragmento de éste utilizando un oligonucleótido delantero correspondiente a la parte final de la región *cox2a* y un oligonucleótido reverso correspondiente a la parte final de la región *cox2b*, pero si el gen *cox2* está fragmentado, entonces no se obtiene producto de PCR. Por lo tanto, en el último caso se procedería con reacciones de PCR utilizando de manera independiente oligonucleótidos para el gen *cox2a* o *cox2b* (Figura 10). Los oligonucleótidos diseñados se degeneraron por dos razones. La primera es porque las algas

seleccionadas para el estudio comprenden diferentes clases y géneros y por lo tanto la preferencia por el uso de codones varía (Vinogradova 2009). La segunda es porque se tomó en cuenta el uso de codones mitocondrial y nuclear, y se ha visto que el primero puede variar entre géneros (Nedelcu 2000).

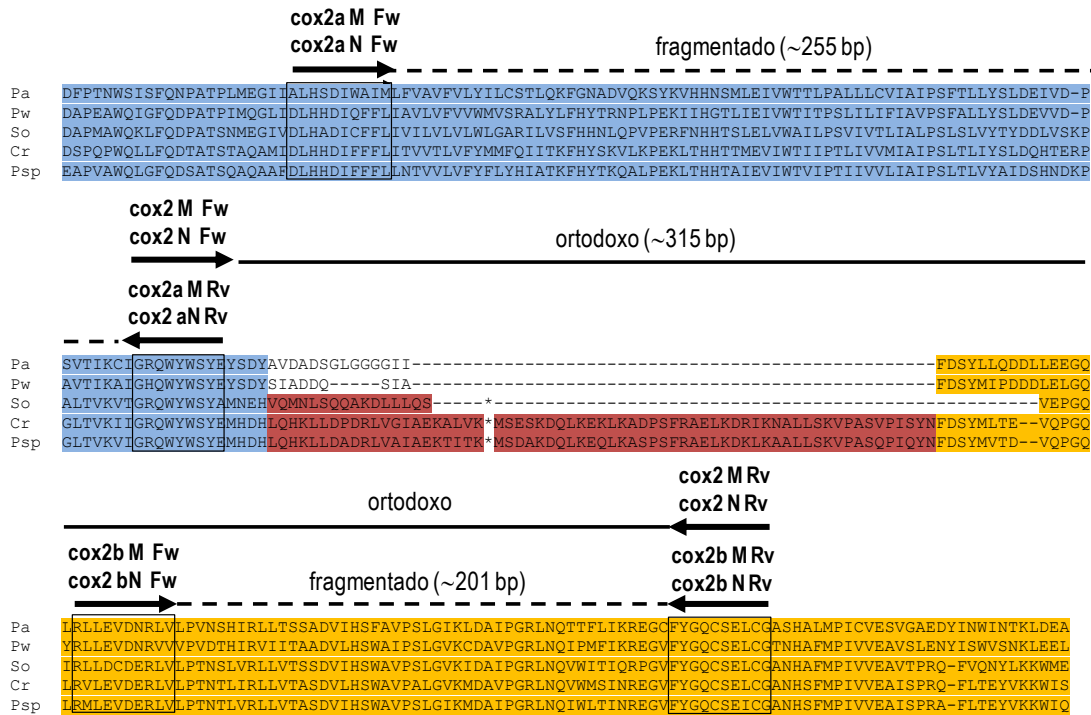
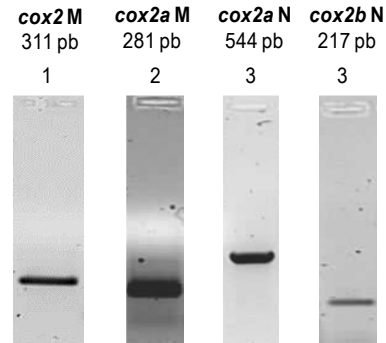


Figura 10. Estrategia para la amplificación de genes *cox2* ortodoxos y fragmentados. Secuencias de aminoácidos de los polipéptidos COXII de *P. akinetum* y *P. wickerhamii*, y COXIIA y COXIIB de *S. obliquus*, *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. Se utilizaron las combinaciones de oligonucleótidos indicadas, con un uso de codones mitocondrial y nuclear (Tabla 6). Los oligonucleótidos y su dirección se representan con las flechas. (A) Producto esperado de un gen *cox2* ortodoxo nuclear o mitocondrial. Si el gen *cox2* está fragmentado entonces no se obtendría ningún producto por PCR. (B) Producto esperado de un gen *cox2a* nuclear o mitocondrial. (C) Producto esperado de un gen *cox2b* nuclear o mitocondrial. El tamaño estimado para cada producto de PCR se indica en pb. Las secuencias de aminoácidos consideradas para el diseño de oligonucleótidos están enmarcadas. Las regiones conceptuales principales se indican con colores: región *cox2a* en azul, región *cox2b* en amarillo y las extensiones amino y carboxilo terminales en rojo. Pa, *P. akinetum*; Pw, *P. wickerhamii*; So, *S. obliquus*; Cr, *C. reinhardtii*; Psp, *Polytomella* sp.

Primero se analizó cada muestra de DNA total para determinar si el gen *cox2* era ortodoxo. Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos para el gen *cox2*, la primera con el conjunto de oligonucleótidos con un uso de codones mitocondrial y la segunda con el conjunto de oligonucleótidos con un uso de codones nuclear. En caso de no obtener un amplificado se procedió con las reacciones de PCR

para determinar la presencia de los genes *cox2a* y *cox2b*. Se realizaron dos reacciones de PCR para cada gen, la primera con el conjunto de oligonucleótidos con un uso de codones mitocondrial y la segunda con el conjunto de oligonucleótidos con un uso de codones nuclear. En la Figura 11 se muestran algunos de los productos de PCR obtenidos.

Figura 11. Amplificación de fragmentos de los genes *cox2*, *cox2a* y *cox2b*. Productos de PCR obtenidos a partir de los DNA totales de (1) *P. impressa*, (2) *S. helveticum* y (3) *C. reinhardtii*. M, mitocondrial, N, nuclear.



Los productos de PCR fueron clonados, secuenciados y depositados en GenBank (Tabla 7). La localización de los fragmentos de gen obtenidos se infirió con base en el conjunto de oligonucleótidos con el que se obtuvo cada producto de PCR (*i.e.* si fue el conjunto de oligonucleótidos con un uso de codones mitocondrial o nuclear).

El resumen de los resultados de PCR obtenidos se muestra en la Tabla 7 e indica lo siguiente. Las algas prasinofíceas *M. pusilla* y *T. gracilis*, la ulvofíceas *P. akinetum* y las trebouxofíceas *P. wickerhamii* y *P. impressa* presentaron un gen *cox2* ortodoxo mitocondrial. Ninguna de las algas clorofíceas analizadas presentó un gen *cox2* ortodoxo, sino que en todas, el gen *cox2* está fragmentado en los genes *cox2a* y *cox2b*. Los resultados de PCR indicaron que todas las algas clorofíceas analizadas tienen un gen *cox2b* nuclear y comprenden a *C. incrassata*, *S. helveticum*, *P. falcata*, *N. aquatica*, *C. hindakii*, *B. aerius*, *B. grandis*, *Bracteacoccus* sp., *C. reinhardtii*, *C. saccatum*, *C. monadina*, *C. applanata*, *Dunaliella* sp., *D. parva*, *T. aeria* y *P. schumacherensis*. En cuanto al gen *cox2a*, los resultados de PCR indicaron que las algas clorofíceas pueden tener un gen *cox2a* mitocondrial o nuclear. Al primer caso pertenecen *C. incrassata*, *S. helveticum*, *P. falcata*, *N. aquatica* y *P. texensis*. Al segundo caso pertenecen *C. reinhardtii*, *C. applanata*, *C. saccatum* y *H. blennista*. También, se identificaron secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes *cox2* mitocondriales y *cox2a* y *cox2b* nucleares en algas clorofíceas mediante ensayos de BLAST (Tabla 7). Se encontró la secuencia de aminoácidos correspondiente a COXII en las prasinofíceas *Micromonas* sp., *N. olivacea*, *O. tauri*, *P. capsulatus*, *P. provasolii*, *T. maculata*; en las ulvofíceas *O. unicellularis*, *O. viridis*, *P. akinetum* y en las trebouxofíceas *C. vulgaris*, *Coccomyxa* sp., *Helicosporidium* sp., *P. wickerhamii* (aislado SAG 263-11), *T. corticola* y *T. jamesii*. De igual forma, se encontraron las secuencias de aminoácidos

correspondientes a COXIIA en las algas clorofíceas *V. carteri*, *H. pluvialis* y *P. parva*, y COXIIB en las algas clorofíceas *C. incerta*, *V. carteri*, *H. pluvialis* y *P. parva* (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Números de acceso en GenBank. Las secuencias no indicadas en esta tabla, pero si en la Tabla 8, no se pudieron depositar ya que GenBank no acepta secuencias con un tamaño menor a 200 pb.

Taxa	Aislado	cox2	cox2a		cox2b	
			Sin intrones	Con intrones	Sin intrones	Con intrones
<i>Bracteacoccus aerius</i>	UTEX 1250	-	-	-	-	JN819439
<i>Bracteacoccus grandis</i>	UTEX 1246	-	-	-	-	JN819440
<i>Bracteacoccus</i> sp.	UTEX 2252	-	-	-	-	JN819441
<i>Chaetophora incrassata</i>	UTEX 1289	-	JN819446	-	-	-
<i>Characium saccatum</i>	UTEX 111	-	-	JN819451	-	-
<i>Chlamydomonas applanata</i>	UTEX 225	-	-	JN819450	-	-
<i>Chlamydomonas incerta</i>	No especificado	-	-	-	ABA01118	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	137C	-	-	AAL37900	XP_001690236	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	UTEX 1062	-	-	JN819449	*	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	UTEX 259	AAR99501	-	-	-	-
<i>Coccomyxa</i> sp.	C-169	YP_004339014	-	-	-	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	UTEX 2505	-	-	DV203769	DV203283	-
<i>Helicosporidium</i> sp.	ATCC 50920	ACT36207	-	-	-	-
<i>Hormotila blennista</i>	UTEX 1239	-	-	JN819452	-	-
<i>Micromonas pusilla</i>	UTEX 991	JN636872	-	-	-	-
<i>Micromonas</i> sp.	RCC299	YP_002860125	-	-	-	-
<i>Neochloris aquatica</i>	UTEX 138	-	JN819445	-	-	-
<i>Nephroselmis olivacea</i>	NIES-484	YP_665680	-	-	-	-
<i>Oltmannsiellopsis unicellularis</i>	CCMP1283	AAR99498	-	-	-	-
<i>Oltmannsiellopsis viridis</i>	NIES 360	YP_684408	-	-	-	-
<i>Ostreococcus tauri</i>	OTTH0595	YP_717296	-	-	-	-
<i>Planktosphaeria texensis</i>	UTEX 1241	-	JN819448	-	-	-
<i>Podohedriella falcata</i>	UTEX 101	-	JN819444	-	-	-
<i>Polytomella parva</i>	No especificado	-	-	EC750969	EC750249	-
<i>Polytomella</i> sp.	198.80	-	-	AAK32115	AAK30366	-
<i>Prasinococcus capsulatus</i>	CCMP 1194	AAR99500	-	-	-	-
<i>Prototheca wickerhamii</i>	263-11	NP_042254	-	-	-	-
<i>Prototheca wickerhamii</i>	1533	JN636874	-	-	-	-
<i>Pseudoclonium akinetum</i>	UTEX 1912	YP_025820	-	-	-	-
<i>Pseudomuriella schumacherensis</i>	SAG 2137	-	-	-	-	JN819442
<i>Pseudotrebouxia impressa</i>	UTEX 892	JN636875	-	-	-	-
<i>Pycnococcus provasolii</i>	CCMP 1203	YP_003495140	-	-	-	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	UTEX 78	-	NP_057974	-	-	JN819443
<i>Stigeoclonium helveticum</i>	UTEX 441	-	JN819447	-	*	-

<i>Trebouxia corticola</i>	UTEX 909	AAR99497	-	-	-	-
<i>Trebouxia jamesii</i>	UTEX 2233	AAR99496	-	-	-	-
<i>Tetraselmis gracilis</i>	UTEX 2563	JN636873	-	-	-	-
<i>Tetraselmis maculata</i>	Butcher	AAF43781	-	-	-	-
<i>Volvox carteri</i>	Eve	-	-	EFJ48734	XP_002948528	-

Tabla 8. Distribución del gen *cox2* ortodoxo y fragmentado en algas verdes. Los círculos negros (●) y blancos (○) indican la presencia del gen especificado en el genoma mitocondrial o nuclear, respectivamente.

Clase	Tipo	Taxa	Aislado	<i>cox2</i>	<i>cox2a</i>		<i>cox2b</i>	
					Sin intrones	Con intrones	Sin intrones	Con intrones
Prasinophyceae	Tipo-ortodoxo	<i>Micromonas</i> sp.	RCC299	●	-	-	-	-
		<i>Micromonas pusilla</i>	UTEX 991	●	-	-	-	-
		<i>Nephroselmis olivacea</i>	NIES-484	●	-	-	-	-
		<i>Ostreococcus tauri</i>	OTTH0595	●	-	-	-	-
		<i>Prasinococcus capsulatus</i>	CCMP 1194	●	-	-	-	-
		<i>Pycnococcus provasolii</i>	CCMP 1203	●	-	-	-	-
		<i>Tetraselmis gracilis</i>	UTEX 2563	●	-	-	-	-
Ulvoephyceae	Tipo-ortodoxo	<i>Tetraselmis maculata</i>	Butcher	●	-	-	-	-
		<i>Oltmannsiellopsis unicellularis</i>	CCMP1283	●	-	-	-	-
		<i>Oltmannsiellopsis viridis</i>	NIES 360	●	-	-	-	-
Trebouxiophyceae	Tipo-ortodoxo	<i>Pseudendoclonium akinetum</i>	UTEX 1912	●	-	-	-	-
		<i>Chlorella vulgaris</i>	UTEX 259	●	-	-	-	-
		<i>Coccomyxa</i> sp.	C-169	●	-	-	-	-
		<i>Helicosporidium</i> sp.	ATCC 50920	●	-	-	-	-
		<i>Prototheca wickerhamii</i>	263-11	●	-	-	-	-
		<i>Prototheca wickerhamii</i>	1533	●	-	-	-	-
		<i>Pseudotrebouxia impressa</i>	UTEX 892	●	-	-	-	-
Chlorophyceae	Tipo-Scenedesmus	<i>Trebouxia corticola</i>	UTEX 909	●	-	-	-	-
		<i>Trebouxia jamesii</i>	UTEX 2233	●	-	-	-	-
		<i>Chaetophora incrassata</i>	UTEX 1289	-	●	-	ND	-
		<i>Stigeoclonium helveticum</i>	UTEX 441	-	●	-	ND	-
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	UTEX 78	-	●	-	-	○
		<i>Podohedriella falcata</i>	UTEX 101	-	●	-	○	-
		<i>Neochloris aquatica</i>	UTEX 138	-	●	-	○	-
		<i>Planktosphaeria texensis</i>	UTEX 1241	-	●	-	ND	-
		<i>Bracteacoccus aerius</i>	UTEX 1250	-	ND	-	-	○
		<i>Bracteacoccus grandis</i>	UTEX 1246	-	ND	-	-	○
		<i>Bracteacoccus</i> sp.	UTEX 2252	-	ND	-	-	○
<i>Pseudomuriella schumacherensis</i>	SAG 2137	-	ND	-	-	○		
Chlorophyceae	Tipo-Chlamydomonas	<i>Characium hindakii</i>	UTEX 2098	-	ND	-	○	-
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	137C	-	-	○	○	-
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	UTEX 1062	-	-	○	○	-
		<i>Chlamydomonas applanata</i>	UTEX 225	-	-	○	○	-
		<i>Characium saccatum</i>	UTEX 111	-	-	○	○	-
		<i>Polytomella</i> sp.	198.80	-	-	○	○	-
		<i>Volvox carteri</i>	Eve	-	-	○	○	-

Chlorophyceae	Tipo-Chlamydomonas	<i>Hormotila blennista</i>	UTEX 1239	-	-	○	ND	-
		<i>Chlamydomonas monadina</i>	UTEX 210	-	-	ND	○	-
		<i>Dunaliella parva</i>	UTEX 1983	-	-	ND	○	-
		<i>Dunaliella</i> sp.	UTEX SP16	-	-	ND	○	-
		<i>Tetracystis aëria</i>	UTEX 1453	-	-	ND	○	-
		<i>Chlamydomonas incerta</i>	No especificada	-	-	○*	○*	-
		<i>Haematococcus pluvialis</i>	UTEX 2505	-	-	○*	○*	-
		<i>Polytomella parva</i>	No especificada	-	-	○*	○*	-
		<i>Chlamydomonas moewusii</i>	SAG 12-2e	-	-	**	**	-
		<i>Dunaliella salina</i>	CCAP 19/18	-	-	**	**	-
		<i>Polytomella capuana</i>	SAG 63-5	-	-	**	**	-
		<i>Polytomella</i> sp.	SAG 63-10	-	-	**	**	-
Pedinophyceae		<i>Pedinomonas minor</i>	UTEX 1350	-	-	**	**	-

* Indica que la información se obtuvo de una base de datos de cDNA (<http://anabench.bcm.umontreal.ca/anabench/>), por lo que la presencia de intrones no se pudo determinar.

** Sugiere la presencia de genes *cox2a* y *cox2b* nucleares dado que los genomas mitocondriales de las respectivas algas carecen del gen *cox2* ortodoxo. Las secuencias reportadas de *C. incerta* y *D. salina* están incompletas; solamente se encuentra disponible la parte correspondiente a la MTS. ND, no determinado; indica que las respectivas reacciones de PCR no se llevaron a cabo.

Presencia de intrones en los genes nucleares *cox2a* y *cox2b*

El tamaño esperado de los productos de PCR correspondientes al gen *cox2a* nuclear era de 250 pb aproximadamente. Sin embargo, los productos correspondientes de las algas clorofíceas *C. applanata*, *C. reinhardtii*, *C. saccatum* y *H. blennista* tuvieron un mayor tamaño, de aproximadamente 500 pb. Asimismo, el tamaño esperado de los productos de PCR correspondientes al gen *cox2b* nuclear era de aproximadamente 200 pb, y coincidió en la mayoría de los casos, excepto en *B. aerius*, *B. grandis*, *Bracteacoccus* sp. y *P. schumacherensis* cuyos productos tuvieron un tamaño de aproximadamente 300 pb. El aumento de tamaño en todos los casos se debió a la presencia de intrones. Cuando estos productos de PCR fueron traducidos, el marco de lectura se vio interrumpido por una serie de codones de paro. Por lo tanto, las respectivas secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el programa AUGUSTUS que detecta la presencia de intrones. La posición de los intrones se indica en las secuencias de nucleótidos traducidas de los productos de PCR de *cox2a* y *cox2b* (Figura 12).

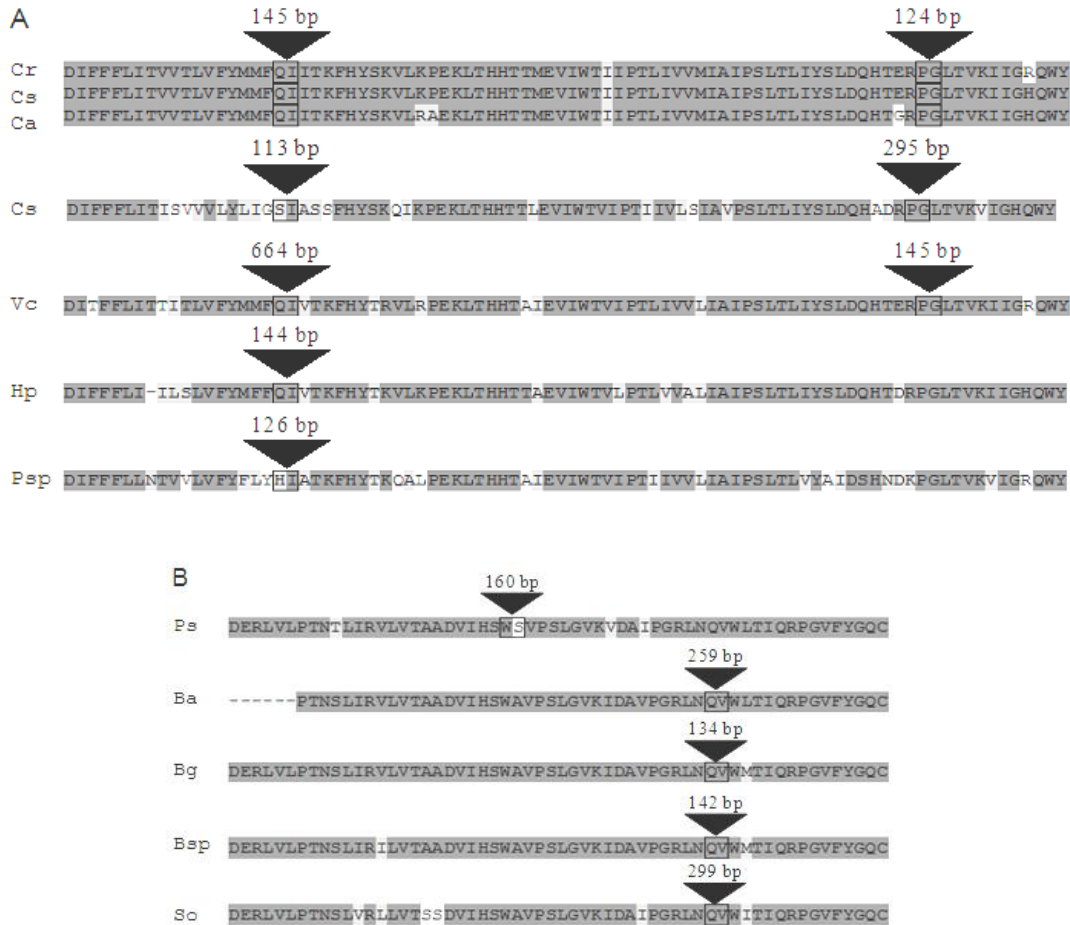


Figura 12. Intrones presentes en los genes nucleares *cox2a* y *cox2b*. Intrones presentes en los fragmentos de los genes *cox2a* y *cox2b*. Para simplificar, se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos obtenidas de los fragmentos de genes *cox2a* (A) y *cox2b* (B) que contienen intrones. Los cuadros negros enmarcan a los dos aminoácidos entre los que se localiza el intrón. Los triángulos negros representan los intrones. El tamaño de cada intrón se indica en pb. Los aminoácidos que son idénticos están resaltados en gris oscuro y los aminoácidos que son equivalentes están resaltados en un tono más bajo de gris. Cr, *C. reinhardtii*; Cs, *C. reinhardtii* (UTEX 1062); Ca, *C. applanata*; Cs, *C. saccatum*; Vc, *V. carteri*; Hb, *H. blennista*; Psp, *Polytomella* sp.; Ps, *P. schumacherensis*; Ba, *B. aerius*; Bg, *B. grandis*; Bsp, *Bracteacoccus* sp.; So, *S. obliquus*.

Se identificaron dos intrones de 145 y 124 pb, respectivamente, en *C. reinhardtii* y *C. applanata*. Ambos intrones son homólogos (porcentaje de identidad >96%) a los intrones que presenta *C. reinhardtii* en las mismas posiciones, previamente reportados (Watanabe 2001). También se identificaron dos intrones en el fragmento de COXIIA de *C. saccatum* y *V. carteri* en las mismas posiciones que en las algas anteriores, sin embargo no son homólogos con los intrones de *Chlamydomonas* y los tamaños son diferentes: 113 y 295 pb,

y 664 y 145 pb, respectivamente. Finalmente, *H. blennista* y *Polytomella* sp. presentan un intrón en la misma posición que el primer intrón de las algas anteriores. Sin embargo, ninguno presenta homología con los intrones anteriores y los tamaños son diferentes: 144 y 126 pb, respectivamente (Figura 12 A).

En los fragmentos de COXII B también se identificaron intrones: *B. aerius*, *B. grandis*, *Bracteacoccus* sp. y *P. schumacherensis* presentan un intrón en la misma posición. Estos intrones se localizan en la misma posición que el intrón previamente reportado para *S. obliquus* (Funes 2002b). No obstante, ninguno de los intrones presenta homología entre sí, a excepción de los intrones de *B. grandis* y *P. schumacherensis* (porcentaje de identidad >81%). El tamaño de estos intrones es distinto para cada alga (Figura 12 B).

En la mayoría de los intrones del fragmento amplificado de los genes *cox2a* y *cox2b* se identificaron secuencias correspondientes a sitios aceptores (5' GT), donadores (3' AG) y de ramificación características de los intrones de tipo I que son procesados y que además, se han reportado previamente en intrones de *C. reinhardtii* (Watanabe 2001, Pérez-Martínez 2002b) (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de intrones. Los sitios aceptores y donadores han sido previamente reportados para intrones de *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. (Pérez-Martínez 2002b). Los sitios de ramificación han sido previamente reportados para intrones de *C. reinhardtii* (Watanabe 2001). El asterisco (*) indica que el sitio aceptor o donador no está reportado, pero es la secuencia que contiene las bases GT o AG más próximas a los sitios 5' o 3', respectivamente, del intrón. La raya (-) indica que no se identificó ningún sitio aceptor, donador o de ramificación.

A Intrones del gen *cox2a*

Alga	Sitio aceptor 5' GT		Sitio donador 3' AG		Sitio de ramificación	
	Primer intrón	Segundo intrón	Primer intrón	Segundo intrón	Primer intrón	Segundo intrón
<i>C. applanata</i>	<u>GTGGGG</u>	-	<u>CGCAG</u>	-	CTGGC	GTCAC
<i>C. reinhardtii</i>	<u>GTGGGG</u>	-	<u>CGCAG</u>	-	CTGGC	GTCAC
<i>C. smithii</i>	<u>GTGGGG</u>	-	<u>CGCAG</u>	-	CTGGC	GTCAC
<i>C. saccatum</i>	<u>GTAAGC*</u>	<u>GTAGGT*</u>	<u>CGCAG</u>	<u>CGCAG</u>	-	CTGGC
<i>H. blennista</i>	<u>GTAGGG*</u>	-	<u>CGCAG</u>	-	-	-
<i>Polytomella</i> sp.	<u>GTAAGT*</u>	-	<u>CGTAG*</u>	-	-	-
<i>V. carteri</i>	<u>GTGGGG</u>	<u>GTGGGT*</u>	<u>CGTAG*</u>	-	CTGAC GTCAC CTCAC	-

B Intrones del gen *cox2b*

Alga	Sitio aceptor 5' GT	Sitio donador 3' AG	Sitio de ramificación
<i>B. aerius</i>	<u>GTGCG*</u>	<u>TACAG*</u>	CTGAA
<i>B. grandis</i>	<u>GTGCG*</u>	<u>CACAG</u>	CTGAC
<i>Bracteacoccus</i> sp.	-	-	CTGAA
<i>P. schumacherensis</i>	<u>GTGCG*</u>	<u>CACAG*</u>	CTGAA GTCAC
<i>S. obliquus</i>	<u>GTGAGG</u>	<u>TGCAG*</u>	GTCAC CTGGC CTCAC

Análisis de las secuencias correspondientes a los genes *cox2*, *cox2a* y *cox2b*

El análisis de las frecuencias de nucleótidos en la tercera posición mostró una preferencia de los fragmentos del gen mitocondrial *cox2*, correspondientes a la región *cox2a* o *cox2b*, por los nucleótidos A + T en la tercera posición. En cambio, los fragmentos correspondientes a los genes nucleares *cox2a* y *cox2b* mostraron una preferencia por los nucleótidos G + C (Figura 13).

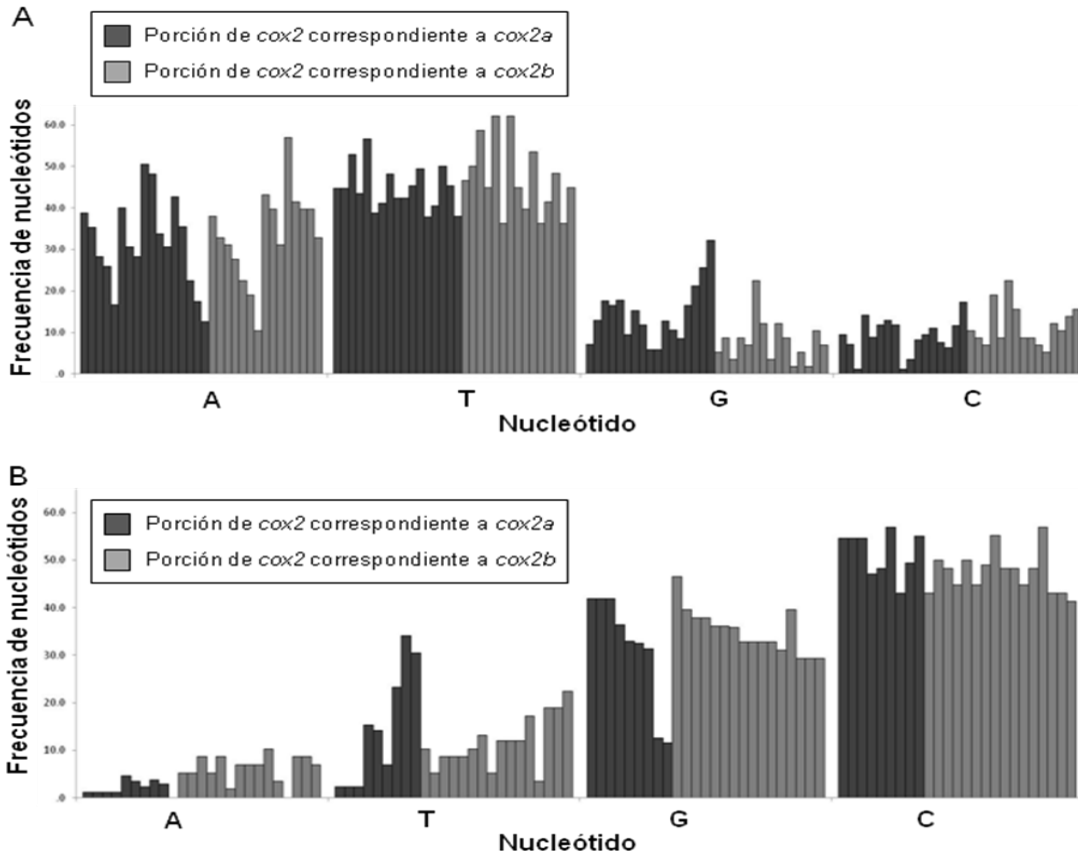


Figura 13. Preferencia de nucleótidos en la tercera posición. La frecuencia de cada nucleótido en la tercera posición se graficó para cada secuencia: (A) Porción mitocondrial equivalente a *cox2a* (gris oscuro) y *cox2b* (gris claro). Los fragmentos se graficaron en el siguiente orden, *cox2a*: *N. olivacea*, *T. maculata*, *Micromonas* sp., *O. tauri*, *P. provasolii*, *O. viridis*, *P. akinetum*, *O. unicellularis*, *Helicosporidium* sp., *P. wickerhamii*, *P. impressa*, *C. vulgaris*, *C. incrassata*, *S. helveticum*, *P. falcata*, *S. obliquus*, *N. acquatica*; y *cox2b*: *T. gracilis*, *T. maculata*, *N. olivacea*, *O. tauri*, *Micromonas* sp., *M. pusilla*, *P. provasolii*, *P. akinetum*, *O. unicellularis*, *O. viridis*, *Helicosporidium* sp., *P. wickerhamii*, *P. wickerhamii* (UTEX 1533), *P. impressa*, *C. vulgaris*. (B) Porción nuclear equivalente a *cox2a* (gris oscuro) y *cox2b* (gris claro). Los fragmentos se graficaron en el siguiente orden, *cox2a*: *C. applanata*, *C. reinhardtii*, *C. reinhardtii* (UTEX 1062), *H. blennista*, *C. saccatum*, *H. pluvialis*, *V. carteri*, *Polytomella* sp., *P. parva*; y *cox2b*: *C. incerta*, *N. acquatica*, *C. hindakii*, *B. grandis*, *T. aeria*, *Bracteacoccus* sp., *B. aerius*, *P. schumacherensis*, *P. falcata*, *C. saccatum*, *H. pluvialis*, *C. applanata*, *D. parva*, *Dunaliella* sp., *C. reinhardtii* (UTEX 1062), *C. monadina*.

Posteriormente, las secuencias de nucleótidos obtenidas por PCR correspondientes a *cox2*, *cox2a* y *cox2b* se tradujeron y se alinearon. Todas presentaron un alto grado de similitud. Solamente las algas de las clases *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae* presentaron un polipéptido COXII codificado por el respectivo gen mitocondrial *cox2* (Figura 14 A). En cambio, las algas de la clase *Chlorophyceae* presentaron únicamente polipéptidos COXIIA y COXIIB. En el caso de COXIIA éste está codificado por el gen *cox2a* mitocondrial o nuclear. En cambio, se observó que COXIIB siempre está codificado por el gen nuclear *cox2b*.

Al comparar las secuencias correspondientes a COXIIA se identificaron diferencias que correlacionan con un gen *cox2a* mitocondrial o nuclear. Los polipéptidos COXIIA codificados por el gen *cox2a* mitocondrial presentan la secuencia R(I/F)NHHT (morado), mientras que los polipéptidos COXIIA codificados por el gen *cox2a* nuclear presentan, en la misma posición, la secuencia KLTHHT (morado). También, se observó que los polipéptidos COXIIA de las algas analizadas pertenecientes a la clase *Chlorophyceae* presentan, en dirección al extremo C-terminal, la secuencia PSL(T/S)L (verde). No obstante, al buscar las secuencias anteriores en la región *cox2a* de los polipéptidos COXII de las clases *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae*, éstas no se encontraron. Sin embargo, se encontraron una secuencias parecidas, pero no consenso (naranja) (Figura 14 B). Asimismo, al comparar las secuencias de COXIIB con la región *cox2b* correspondiente de los polipéptidos COXII de las algas de las clases *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae*, se identificó la secuencia consenso ERLV (verde) en los COXIIB y NRVV (naranja) en COXII (Figura 14 C).

Figura 14. Alineamiento múltiple de COXII. Alineamiento de los aminoácidos codificados por los fragmentos amplificados del gen *cox2* mitocondrial ortodoxo (A), de los genes *cox2a* nucleares y mitocondriales (B) y de los genes *cox2b* nucleares (C). (A) La barra indica el final de la región correspondiente a *cox2a* y el inicio de la región correspondiente a *cox2b*. (B) Los aminoácidos consenso en COXIIA están resaltados: en verde si son comunes para COXIIA mitocondriales y nucleares; en morado, si corresponden a COXIIA nucleares; en azul, si corresponden a COXIIA mitocondriales; y en naranja si corresponden a COXIIA mitocondriales ortodoxos. (C) Los aminoácidos consenso en COXIIB están resaltados: en verde si son corresponden a COXIIB nucleares y en naranja si corresponden a COXIIB mitocondriales ortodoxos. Los aminoácidos que son idénticos están resaltados en gris oscuro y los aminoácidos que son equivalentes están resaltados en gris claro. Los números en la parte superior del alineamiento indican la posición relativa de los aminoácidos con respecto a la secuencia de COXII de *P. provasolii*. Los números de acceso correspondientes a cada secuencia se indican en la Tabla 8.

A

141 | 163 | 240

Pp GHQWYSY EYADVAIDDT-----TAVVYDSYIIPEDDLEL GQLRLLLEVDNRVVLPSNTHIRVIVTAADVLSWAVPSLGIKCDAVPGRLNQVSIYMQRFVGFVFGQCSELC

Msp GHQWYWTYELSDYSTADD-----ASLVFDSYMIPEDDLTGLQLRLLLEVDNRVVLVPHVTHVRVIVTAADVLSWAVPSLGKCDVAVPGRLNQTSFFLQREGIFYGQCSEIC

Mp GHQWYSYELSDYSGDET-----PSLVFDSYMPEDDLEL GQLRLLLEVDNRVLPETHVTRVIVTAADVLSWAVPSLGKCDVAVPGRLNQTSFYLQREGVIFYGQCSELC

No GHQWYSY EYSDYP-----ETIAFDSYMIPEEDEL GQLRLLLEVDNRVVPFAHTHIRIITAADVLSWAVPSLGIKCDAVPGRLNQVSTFIQREGVIFYGQCSEIC

Ot GHQWYWTY EYSDYSLSD-----GSLVFD SYMIPEDDLEL GQLRLLLEVDNRVVLVPHVTHIRIITAADVLSWAVPSLGKCDVAVPGRLNQTSVFLKREGVIFYGQCSEIC

Tg GHQWYSY EYSDYNT EDE-----TLINFD SYMIPEDDLSL GQLRLLLEVDNRVVPVKTHIRVIVTAADVLSWAVPSLGIKCDAVPGRLNQVNLFLKREGVIFYGQCSELC

Tm GHQWYSY EYSDYNT EDE-----TLINFD SYMIPEDDLSL GQLRLLLEVDNRVVPVKTHIRVIVTAADVLSWAVPSLGKCDVAVPGRLNQVNLFLKREGVIFYGQCSELC

Ou GIQWLWQY EYSDYSTDESS-IESSGIQFESYMIPEDELEPGQYRLLETDNRVVLPVDTHIRVIVTGS DVIH SWAIPSLGIKVDVAVPGRLNQTSMFIKREGVIFYGQCSEIC

Ov GIQWLWQY EYSDYSTDESS-IESNGIQFESYMIPEDELEPGQYRLLETDNRVVLPVDTHIRVIVTGS DVIH SWAIPSLGVKTDALPGRLNQTSIFIKREGVIFYGQCSEIC

Pa GRQWYSY EYSDYAVDADSGLGGGGIIFDSYLLQDDLEEGQLRLLLEVDNRVLPVNSHIRLITSSADVIHSFVAVPSLGIKLDAIPGRLNQTTFLIKREGCFYGGQCSELC

Cv GHQWYSY EYSDYQSDD-----QSI TFD SYMIPDDDEL GQLRLLLEVDNRVVPFANTHLRLIITAADVLSWAVPSLGAKCDVAVPGRLNQIPVFIKREGVIFYGQCSELC

Hsp GHQWYSY EYSDFN ETD-----QTIAFDSYMIPE SDELE GQLRLLLEVDNRVVLVPHVTHIRVIVTAADVLSWAVPSLGKCDVAVPGRLNQIPLFIKREGVIFYGQCSELC

Pw GHQWYSY EYSDYSLADD-----QSI AFD SYMIPDDDEL GQFRLLLEVDNRVVPVETHLRFIITAADVLSWAVPSLGKCDVAVPGRLNQVPVFIKREGVIFYGQCSELC

Pi GHQWYSY EYSDYNQSD-----EGLLFD SYMIPEDDLEL GQYRLLDVDNRVVPVNTHIRMIITSSADVLH SWAVPSLGKVDVAVPGRLNQTPIFIKREGVIFYGQCSELC

B

61 | 141

Pp DVEGFMLFIL-GFVLWII SRTLWHFTISESYRFDNEVVA KIVHNSFVETVWTVAPS FMLIAIAV PSFALLYSMDEVVE-PSVTLKVVGHQWY

No DIFFFIVFVT-CFVVMVLRVTLYHFHHTKNPIP-----E KIVHGTAEIEIWTVTPSLILILIAV PSFALLYSMEVVD-PALTVKAIGHQWY

Msp DICFFMVVVL-TFVIWMLCRTLWHFHWTKNPIP-----S KIIHGTVEIWAIVTPSLILMVAIAV PSFALLYSMDEIVN-PSITLKAIGHQWY

Ot DICFFMIVVL-VFVWMLLRTLWHFHWTKNPPV-----S KIIHGTFL ETVWITP S FILMIAV PSFALLYSMDEIVD-PSLTLKVIGHQWY

Tm DISFFLLTIV-IFVGMFLERTLWHFNSISNPIP-----S KIIHGTIEIAWITP S LILVIAV PSFALLYSMDEVVD-PAITLKAIGHQWY

Ou DIMFFLVATT-IFVLWMLTRALVLFHEKNPQP-----E KIIHGT EIEIGWITP S LILVIAV PSFALLYSLDEVVD-PAITLKV MGIQWL

Ov DIMFFLVAIT-IFVLWMLTRALVLFHEKNPQP-----E KIIHGT EIEIGWITP S LILVIAV PSFALLYSLDEVVD-PAITLKV MGIQWL

Pa DIWAIMLFVA-VFVLYILCSTLQKFGNADVQKS-----YKVHNSMLEIVWITL PALLLCVIAI PSFTLLYSLDEIVD-PSVTIKCIGRQWY

Cv DIVFFMILII-VFVLWMITR TLYHFHYKKNPIP-----E KIIHGTAEIEIAWITVTPSLILVIAV PSFALLYSLDEVVD-PAVTIKAIGHQWY

Hsp DIQFFLLIIVC-VFVWVLRALYHFHASKNPIP-----E KIIHGT FIEIAWITVTPSLILIFIAV PSFALLYSLDEVVD-PSVTIKAIGHQWY

Pw DIQFFLLIAVL-VFVWVMSRALYLFHYTRNPLP-----E KIIHGT LIEIVWITP S LILIFIAV PSFALLYSLDEVVD-PAVTIKAIGHQWY

Pi DIFFFLLLVILV FVIWMLARTLYHFHQSRNPVE-----E KILHGT EIEIAWITVTPSLILVIAI PSFALLYSMDEVVD-PAVTIKAIGHQW-

Tipo-Scenedesmus

Ci DIFFFLVV-IFTVFWLGT KILYRFHYTNQSLP-----E RINHHTNLEL IWSILPSLIILS IAF PSLTLIYSLDDQVETPGLTVKVVGHQWY

Sh DIFFFLLV-IFTVFWLGT KILYRFHYTNQSLP-----E RINHHTNLEL IWSILPSLIILS IAF PSLTLIYSLDDQVETPGLTVKIVGHQWY

Pf DIFFFLLV-ILVVLWLGGRFVTSFHYAKQVVP-----E RFNHHTNLEL VVAI LPSLIVTLIAL PSLTLIYTFDDLVTKPALT VKV-----

Na DIFFFLLITILILVWLGARIVYRFHHTRMPVP-----E RFNHHTSLEL IWAIPSLVVTMIYL PSLTLIYTFDDLINKPRLTVKVVGHQWY

Pt DIFFFLLT-ILVVLWVGGRIVAFHHTAQMP-----E RFNHHTNLEL IWAIPSLVHTLIAL PSLTLIYTFDDLNDYELTVKIVGHQWY

So DICFFLIV-ILVVLWLGARILVSFHHNLQPVP-----E RFNHHTSLEL VVAI LPSVIVTLIAL PSLSLVYTYDDL VSKPALT VKVTVGRQWY

Tipo-Chlamydomonas

Ca DIFFFLLIT-VVTLV FYMMFQ IITKFHYSKVLRA-----E KLTHHTTMEVIWIT IPTLIVVMIAI PSLTLIYSLDQHTGAPGLTVKIVGHQWY

Cr DIFFFLLIT-VVTLV FYMMFQ IITKFHYSKVLKP-----E KLTHHTTMEVIWIT IPTLIVVMIAI PSLTLIYSLDQHTERPGLTVKIVGHQWY

Cs DIFFFLLIT-ISVVVLYLIGS IASSFHYSKQIKP-----E KLTHHTTLEVIWIT IPTIIVLS IAV PSLTLIYSLDQHADRPGGLTVKIVGHQWY

Hp DIMFFLLIT-VIVLV FYLLAQISTKFHYSRQLKP-----E KLTHHTTLEVIWIT IPTFIVLS IAV PSLTLIYSLDQHNDRPGGLTVKIVGRQWY

Hb DIFFFLLI--ILSLV FYMFQ IVTKFHYTKVLKP-----E KLTHHTTAEVIWIT VLP TLVVAIAI PSLTLIYSLDQHTDRPGGLTVKIVGHQWY

Pp DIFFFLLN-TVVLV FYFLYH IATKFHYTKQALP-----E KLTHHTTAEVIWIT IPTIIVVLI AI PSLTLVYAMDS-----

Psp DIFFFLLN-TVVLV FYFLYH IATKFHYTKQALP-----E KLTHHTTAEVIWIT IPTIIVVLI AI PSLTLVYAI DS HNDKPGGLTVKIVGRQWY

Vc DIFFFLLIT-TITLV FYMMFQ IVTKFHYTRVLRP-----E KLTHHTTAEVIWIT IPTLIVVLI AI PSLTLIYSLDQHTERPGLTVKIVGRQWY

C 141 240

Pp DSRVVLPSNTHIRVIIVTAADVLSWA VPSLGIKCDAVPGRLNQVSIYMQRFGVFFGQC
No DNRVVVFAHTHIRIIITAADVLSWA VPSLGIKCDAVPGRLNQVSTFIQREGVFFYGQC
Mp DNRLVLPFH THVRVLIITAADVLSWA I PSLGVKCDVPGRLNQTSFYLQREGVFFYGQC
Msp DNRVVL FVH THVRVIIVTAADVLSWA VPSLGVKCDAVPGRLNQTSFFLQREGIFYGQC
Ot DNRVVL FVH THIRIIITAADVLSWA VPSLGVKCDAVPGRLNQTSVFLKREGVFFYGQC
Tg DNRVVV FVK THIRVLIITAADVLSWA I PSLGIKCDAVPGRLNQVNLFLKREGVFFYGQC
Tm DNRVVI FVK THIRVLIITAADVLSWA I PSLGVKCDVPGRLNQVNLFLKREGVFFYGQC
Ou DNRVVL FVD THIRVLIITGSDVIH SWA I PSLGIKVDVPGRLNQTSMFILKREGVFFYGQC
Ov DNRVVL FVD THIRVLIITGSDVIH SWA I PSLGVKTDALPGRLNQTSIFILKREGVFFYGQC
Pa DNRLVLPVNSHIRLLTSSADVHSEAVPSLGIKLDIAPGRLNQTTFLIKREGCFYGQC
Cv DNRMVVEANTHIRLIITAADVLSWA VPSLGAKCDVPGRLNQIPVFIKREGVFFYGQC
Hsp DNRVVL FVK THIRVIITAADVLSWA VPSLGVKCDAVPGRLNQIPFLIKREGVFFYGQC
Pw DNRVVV FVE THIRFIITAADVLSWA I PSLGVKCDVPGRLNQVPVFIKREGVFFYGQC
Pi DNRVVV FVN THIRMIITSDADVLSWA VPSLGVKTDVPGRLNQTPIFIKREGVFFYGQC

NRVV

Tipo-Scenedesmus

So DERLVLPTNSLVRLLVTASDVIH SWAVPSLGVKIDAI PGRLNQVWITIQRPGVFFYGQC
Pf DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGVKIDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Na DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGVKIDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Ch DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWVPSLGIKMDAVPGRLNQVWLNINREGVFFYGQC
Ba -----PTNSLIRVLTAAADVH SWAVPSLGVKIDAVPGRLNQVWITIQRPGVFFYGQC
Bg DERLVLPTNSLIRVLTAAADVH SWAVPSLGVKIDAVPGRLNQVWMTIQRPGVFFYGQC
Bsp DERLVLPTNSLIRVLTAAADVH SWAVPSLGVKIDAVPGRLNQVWMTIQRPGVFFYGQC
Ps DERLVLPTNLIIRVLTAAADVH SWSVPSLGVKIDAI PGRLNQVWITIQRPGVFFYGQC

ERLV

Tipo-Chlamydomonas

Ca DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGVKIDAVPGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Ci DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGVKIDAVPGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Cm DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGVKIDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Cr DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGIKCDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Cs DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGVKIDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Dp DERLVLPTNLIIRVLTAAADVLSWA VPSLGVKCDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Dsp DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGIKCDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Hp DERLVLPTNLIIRVLTASDVIH SWAVPSLGVKIDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Pp DERLVLPTNLIIRVLTASDVIH SWAVPSLGIKMDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Psp DERLVLPTNLIIRVLTASDVIH SWAVPSLGIKMDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC
Ta DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGIKMDAVPGRLNQVWLNINREGVFFYGQC
Vc DERLVLPTNLIIRVLTASDVLH SWAVPSLGVKMDAI PGRLNQVWITINREGVFFYGQC

ERLV

Identificación de MTS en el gen *cox2a* y de extensiones en los genes *cox2a* y *cox2b*

Las proteínas que participan en la fosforilación oxidativa en algas clorofíceas y que están codificadas por genes nucleares, se caracterizan por presentar MTS largas (*i.e.* entre 100 y 140 aminoácidos) (González-Halphen 2004, Figueroa-Martínez 2008). En las secuencias de aminoácidos correspondientes a COXIIA identificadas por BLAST en las algas clorofíceas *V. carteri* y *P. parva* se identificó la secuencia completa correspondiente a la MTS. En las algas *C. incerta*, *D. salina* y *H. pluvialis* también se identificó una secuencia de MTS, pero ésta fue parcial (*i.e.* no está reportada la secuencia completa) (Figura 15 A). Todas las MTS presentaron un alto grado de similitud entre sí.

También, se identificó mediante BLAST que el cromosoma 17 del genoma nuclear del alga prasinofícea *O. tauri* (DOE JGI) presenta un fragmento homólogo al gen *cox2* mitocondrial. Al analizar el fragmento (XP_003083974) se encontró que está constituido por tres exones y dos intrones. El primer exón, de acuerdo a las predicciones de localización intracelular (TargetP), corresponde a un péptido señal que confiere localización mitocondrial (*i.e.* MTS). El segundo exón corresponde a fragmentos de los genes mitocondriales *nad6* y *tRNA-Asn*. El tercer exón número es idéntico a un fragmento del gen *cox2* mitocondrial. No obstante, aún se desconoce si las secuencias anteriores corresponden a un gen funcional: (1) no se tiene evidencia experimental de su expresión; (2) la secuencia del genoma nuclear de *O. tauri* no ha sido completamente ensamblada ni anotada; (3) el fragmento está ausente en el genoma nuclear del alga prasinofícea *O. lucimarnus*, del mismo género pero de diferente especie.

Se realizó un análisis filogenético comparando las MTS de las proteínas COXIIA codificadas por el gen *cox2a* nuclear de clorofíceas, y de las proteínas COXII codificadas por los genes nucleares *cox2* de legumbres y del alga prasinofícea *O. tauri*. En algunas legumbres el gen *cox2* mitocondrial migró intacto al genoma nuclear y adquirió una MTS (Adams 1999). En el análisis filogenético se observa que las MTS de las proteínas COXII de legumbres se localizan en un grupo independiente al que comprende las MTS de proteínas COXIIA de algas verdes. Incluso, la MTS de COXII de *O. tauri* se localiza en una rama independiente a los grupos anteriores. El árbol obtenido apoya la hipótesis que la migración de genes *cox2* al núcleo sucedió de manera independiente en ambos grupos (Figura 15 B).

A

```

Ci  MLRQSGLSANKLFC--SNLLQSQQKEGN---KLVVNAML FSSKAEGSAVQCVVASEGVAQAVPQFSSEAAAAAIAAKRRGL
Cr  MLRQSGLSANKLFC--SNLLQSQQKEGN---KLVVNAML FSSKAEGSAVQCVVASEGVAQAVPQFSSEAAAAAIAAKRRGL
Vc  MLRQSGLSANKLFC--SNLLQSQQKEGN---KLVVNAML FSSKAEGSAVQCVVASEGVAQAVPQFSSEAAAAAIAAKRRGL
Ds  -----ALAAKKAHL
Hp  -----
Pp  --AQRISSGNSLQC-----G--KYMVNAACMGSKNIATVSEITVQASTAAPKVGAQFSFKEASAMASKKQNV
Psp MLAQRISSGNSLQC-----G--KYMVNAACMGSKNIATVSEITVQASTAAPEVGAQFSFKEASAMASKKQNV

Ci  IGSGMSLAPSKPFAARGLTSPAK-PAAAAATA---TEAAQPADKYAGLKKVLKAAAALAAALGLTITTT-----
Cr  IGSGMSLAPSKPFAARGLTSPAK-PAAAAAAG-AEAAQPADKYAGLKKVLKAAAALAAALGLTITTAADS PQFWQLL
Vc  IGSGISLKPSPFVRGLATSSP-ASAASTAAPAAAAQPTDKYTALKKLLKLAAMVAAMGLTATTAADS PDYWQLG
Ds  TGAGGLVGSSTSRGFGSFAASGSAQASSAASAAQAQAQEKPSLLRRIAQAADVAGACMLASGVASADSPEFWQWL
Hp  -----ILQGVTVLVVGAMLAATTAAADAPEAWQWL
Pp  VGSGLSLASRQTFS--GSFAAS--APSGARAIATQAEAKAQTEETSISIKKFKAAAAVVAALGLTAGTASAEAFVWQLG
Psp VGSGLSLASRQTFS--GSFAAS--APSGARAIATQAEAKAQTEETSISIKKFKAAAAVVAALGLTAGTASAEAFVWQLG

```

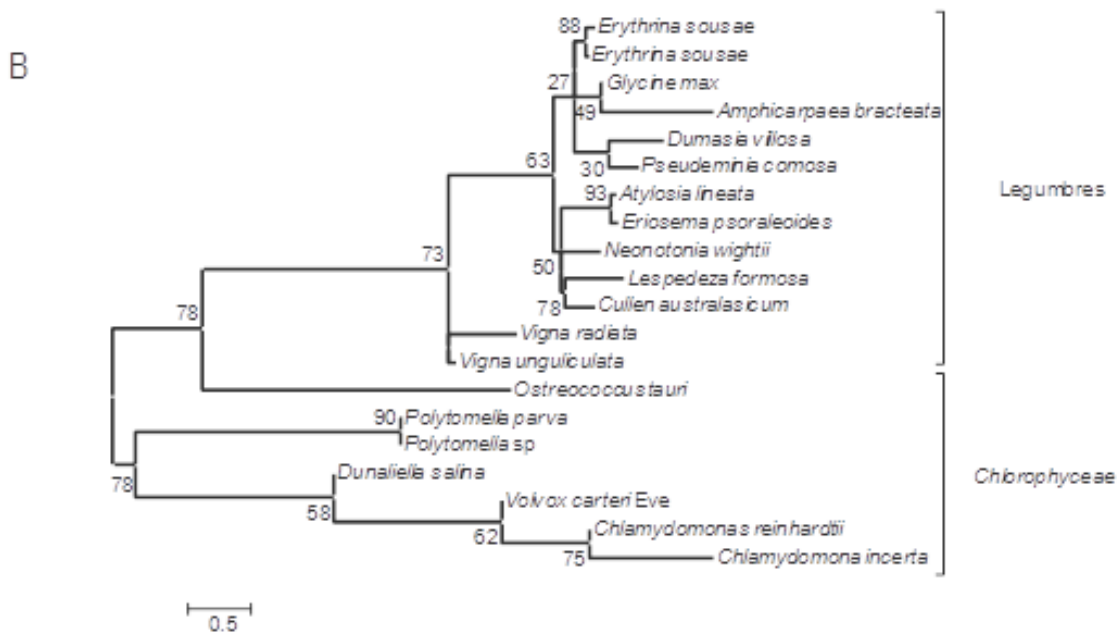


Figura 15. Presecuencias de localización mitocondrial (MTS). (A) Alineamiento de las MTS codificadas por los genes *cox2a* nucleares de clorofíceas. Ci, *C. incerta*; Cr, *C. reinhardtii*; Vc, *V. carterii*; Ds, *D. salina*; Hp, *H. pluvialis*; Pp, *P. parva*; Psp, *Polytomella* sp. Los aminoácidos que son idénticos están resaltados en gris oscuro y los aminoácidos que son equivalentes están resaltados en gris claro. (B) Árbol consenso inferido a partir de 500 replicados, utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) basado en el modelo que utiliza la matriz de Whelan y Goldman (WAG). Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias en la tasa evolutiva entre sitios [cinco categorías (+G, parámetro = 7.4310)]. Se obtuvieron árboles similares con los métodos de MP, ME y NJ. El análisis involucró 20 secuencias de aminoácidos y un total de 163 posiciones en el alineamiento final de datos. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas. El porcentaje de árboles replicados (500) en los que los taxa asociados se agruparon conjuntamente se muestran junto a las ramas (prueba de bootstrap). La barra inferior indica el número de sustituciones por sitio. Los números de acceso correspondientes a cada secuencia de clorofitas se indican en la Tabla 8. *E. sousae*

(AAF15331), *G. max* (ACU24053), *A. bracteata* (AAF15327), *D. villosa* (AAF15330), *P. comosa* (AAF13874), *A. lineata* (AAF15328), *E. psoraleoides* (AAF15339), *N. wightii* (AAF14574), *L. formosa* (AAF15333), *C. australasicum* (AAF15329), *V. radiata* (AAF15334), *V. unguiculata* (AAF19523), *O. tauri* (CAL57941), *D. salina* (BM449177).

Los polipéptidos identificados de COXIIA de *V. carteri* y *H. pluvialis* presentan extensiones C-terminales. También, los polipéptidos correspondientes a COXII B identificados por BLAST en *C. incerta*, *V. carteri*, *H. pluvialis* y *P. parva* presentan extensiones N-terminales (Figura 16 B). En el caso de *S. obliquus* la extensión C-terminal del gen *cox2a* ya está reportada (Pérez-Martínez 2001), pero no la extensión N-terminal del gen *cox2b*. Ésta última se obtuvo mediante reacciones de PCR anidados a partir de DNA total de *S. obliquus*. Tanto las extensiones C-terminales como las N-terminales presentaron un alto grado de similitud entre ellas.

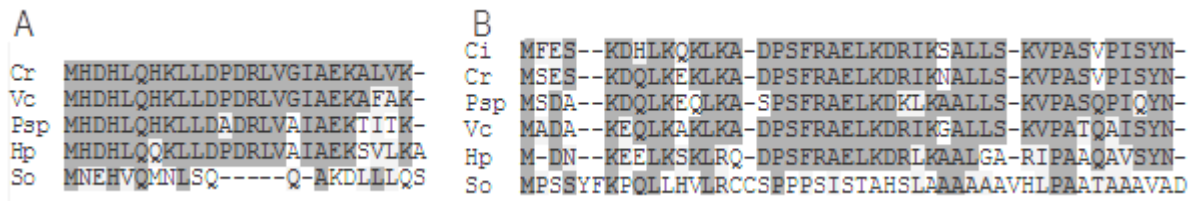


Figura 16. Extensiones codificadas por los genes *cox2a* y *cox2b*. (A) Alineamiento de las extensiones C-terminales codificadas por los genes *cox2a* nucleares de Cr, *C. reinhardtii*; Vc, *V. carteri*; Psp, *Polytomella* sp.; Hp, *H. pluvialis* y por el gen *cox2a* mitocondrial de So, *S. obliquus*. (B) Alineamiento de las extensiones N-terminales codificadas por los genes *cox2b* nucleares de Ci, *C. incerta*; Cr, *C. reinhardtii*; Vc, *V. carteri*; Psp, *Polytomella* sp.; Hp, *H. pluvialis*; So, *S. obliquus*. Los números de acceso correspondientes a cada secuencia se indican en la Tabla 8. Los aminoácidos que son idénticos están resaltados en gris oscuro y los aminoácidos que son equivalentes están resaltados en gris claro.

Grupos de algas clorofíceas con base en la localización del gen *cox2a*

Con base en los resultados obtenidos con respecto a al gen *cox2*, las algas verdes se observan dos grandes grupos (Tabla 7). El primero comprende aquellas algas que tienen un gen *cox2* mitocondrial ortodoxo e incluye a las clases *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae*. Los taxa pertenecientes a este grupo se han denominado de “tipo-ortodoxo” (Figura 14 A). El segundo comprende aquellas algas que tienen un gen *cox2* fragmentado e incluye solamente a la clase *Chlorophyceae*. Este grupo se subdivide en dos tipos de algas denominados por nosotros “tipo-*Scenedesmus*” y “tipo-*Chlamydomonas*” (Figura 14 B y C) Los taxa pertenecientes al grupo tipo-*Scenedesmus* presentan un gen *cox2a* mitocondrial y un gen *cox2b* nuclear. Los taxa pertenecientes al grupo tipo-*Chlamydomonas* presentan genes *cox2a* y *cox2b* nucleares.

Análisis filogenético de las algas clorofíceas con base en los genes *cox2*, *cox2a* y *cox2b*

Con el fin de determinar si las relaciones filogenéticas que existen entre las algas verdes están representadas con la fragmentación y localización del gen *cox2*, se llevaron a cabo análisis filogenéticos. Se utilizaron las secuencias traducidas (*i.e.* aminoácidos) para evitar posibles artificios generados por las diferencias que existen entre algas clorofíceas con respecto al contenido de GC de los genomas mitocondriales (Smith 2011), a la heterogeneidad de uso de codones (Inagaki 2004), y a las diferencias en el uso de codones entre los genes mitocondriales y nucleares.

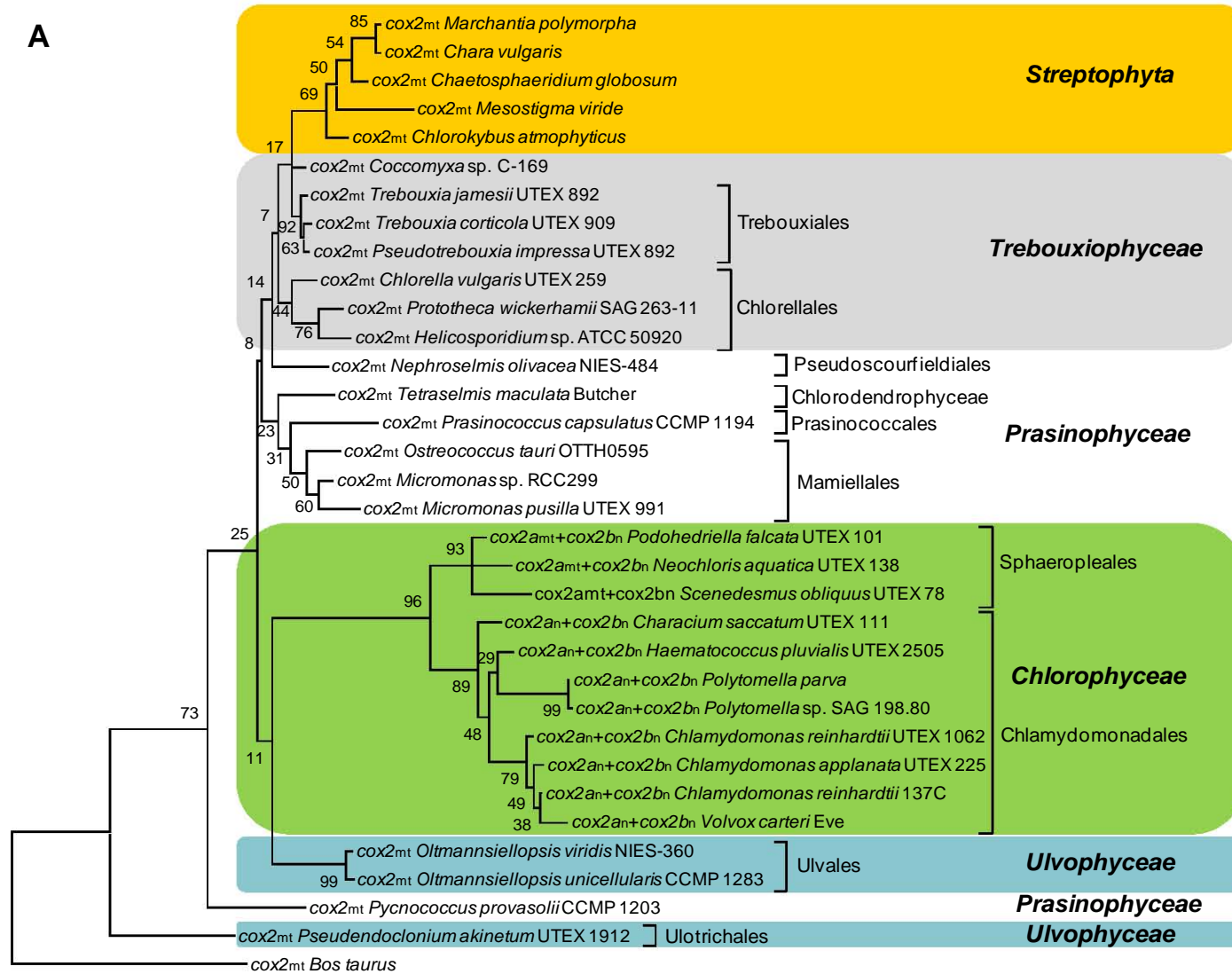
Se construyeron árboles a partir de las secuencias de COXIIA, COXIIB y la concatenación de COXIIA con COXIIB. En la Figura 17 se muestran los mejores árboles obtenidos para COXIIA (Panel A) y COXIIA concatenado con COXIIB (Panel B). En ambos árboles se observa que las algas pertenecientes a cada uno de las cuatro clases principales de algas verdes se agrupan y se separan en grupos individuales: *Prasinophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae* y *Chlorophyceae*. En el árbol del concatenámero COXIIA-COXIIB el alga prasinofícea *P. provasolii* se separa del grupo principal y el alga ulvofícea *P. akinetum* se separa del grupo principal. Las clases *Chlorophyceae* y *Ulvophyceae* se resuelven como grupos hermanos entre sí y a su vez conforman un grupo hermano de las clases *Prasinophyceae* y *Trebouxiophyceae*. La clase *Chlorophyceae* se divide en tres grupos: uno que incluye a las algas del orden Chlamydomonadales y otro que incluye a las algas del orden Sphaeropleales y Chaetophorales. Asimismo, en el árbol de COXIIA el alga prasinofícea *N. olivacea* se separa del grupo principal. La clase *Chlorophyceae* se resuelve como un grupo hermano con respecto de las demás clases (*Prasinophyceae*, *Trebouxiophyceae* y *Ulvophyceae*). En este caso, la clase *Chlorophyceae* se divide solamente en dos grupos: uno que incluye a las algas del orden Chlamydomonadales y otro que incluye a las algas del orden Sphaeropleales.

La división observada con respecto a los órdenes concuerda con la fragmentación y localización del gen *cox2*: las algas del orden Chlamydomonadales tienen genes *cox2a* y *cox2b* nucleares; las algas del orden Sphaeropleales tienen un gen *cox2a* mitocondrial y un gen *cox2b* nuclear; y las algas del orden Chaetophorales tienen un gen *cox2a* mitocondrial y probablemente también tengan un gen *cox2b* nuclear, sin embargo esto no se pudo determinar experimentalmente.

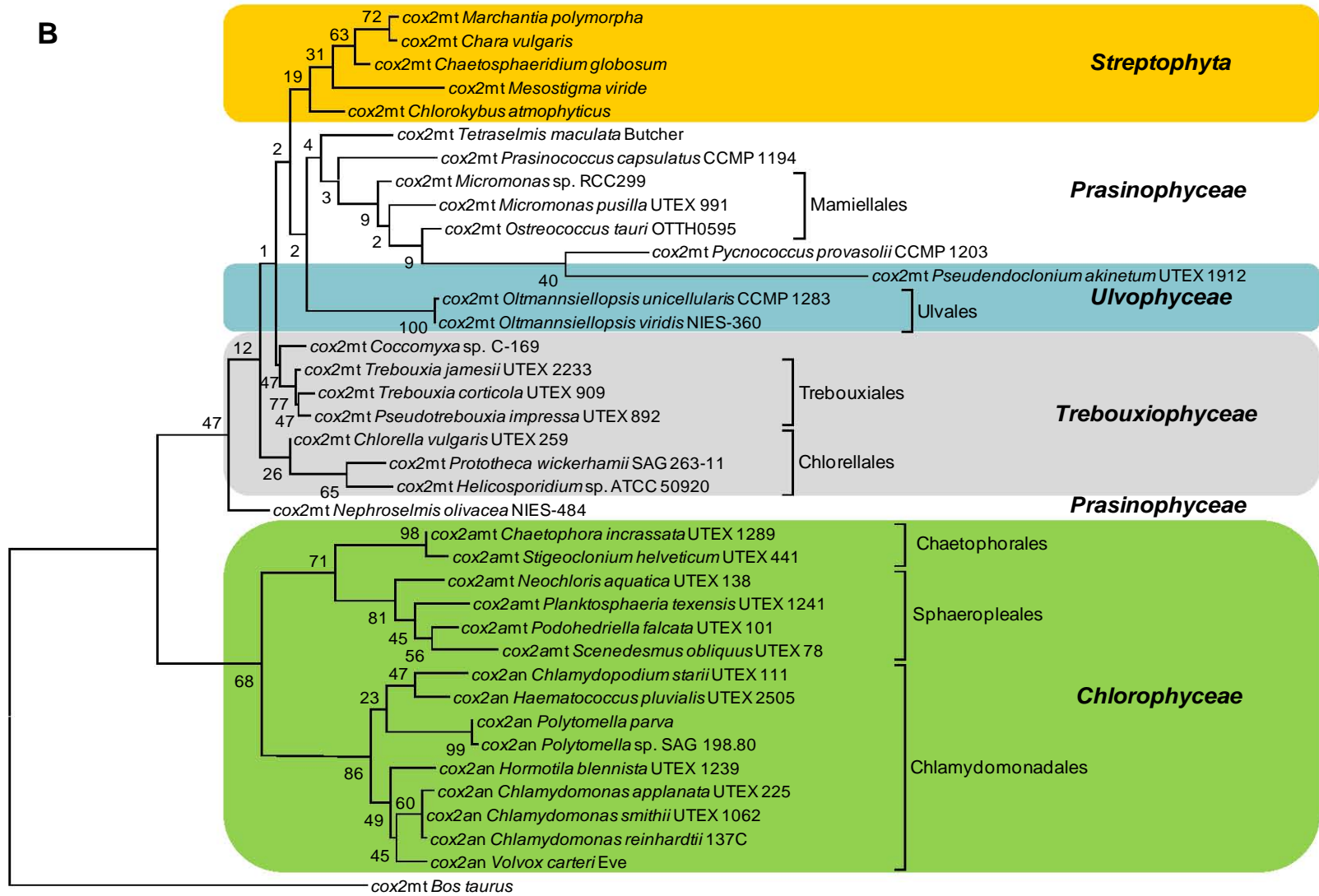
Figura 17. Análisis filogenético de las proteínas COXII de clorofitas. Los árboles se obtuvieron utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) basado en el modelo de Jones-Taylor-Thornton. Se obtuvieron árboles similares con los métodos de MP, ME y NJ. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas. El porcentaje de árboles replicados (500) en los que los taxa asociados se agruparon conjuntamente se muestran junto a las ramas (prueba de bootstrap). La barra inferior indica el número de sustituciones por sitio. Los números de acceso correspondientes a cada secuencia de clorofitas se indican en la Tabla 8. Ambos árboles se enraizaron con COXII de *Bos taurus* (AAQ06596) y se utilizaron cinco secuencias de COXII pertenecientes a miembros del grupo *Streptophyta* como grupo externo: *M. polymorpha*

(NP_054434), *C. vulgaris* (NP_943691), *C. globosum* (NP_689368), *M. viride* (AAL36743), *C. atmophyticus* (YP_001315116). (A) Proteínas COXIIA y COXIIB concatenadas. Árbol consenso inferido a partir de 500 replicados con el log más alto de similitud (-3586.3982). El análisis involucró 34 secuencias de aminoácidos y un total de 150 posiciones en el alineamiento final de datos. (B) Proteínas COXIIA. Árbol consenso inferido a partir de 500 replicados con el log más alto de similitud (-2745.6976). El análisis involucró 38 secuencias de aminoácidos y un total de 92 posiciones en el alineamiento final de datos. Los taxa pertenecientes a diferentes órdenes, se indican con paréntesis. mt, mitocondrial, n, nuclear.

A



B



Identificación de proteínas ASA

Mediante análisis bioinformáticos que consistieron en análisis de BLAST se encontraron homólogos de las proteínas ASA en algas verdes de la clase *Chlorophyceae* (Tabla 10).

Tabla 10. Subunidades ASA presentes en algas clorofíceas. Proteínas ASA 1 a 9 que se expresan en Cr, *C. reinhardtii*; Ci, *C. incerta*; Psp, *Polytomella* sp.; Pp, *P. parva*; Vc, *V. carteri*; So, *S. obliquus*. Los espacios en blanco indican que no se encontró ninguna proteína semejante a la subunidad ASA correspondiente para cada caso, pero por falta de información su presencia o ausencia aún no puede ser descartada. *Vázquez-Acevedo 2006, **Lapaille 2010.

ASAs	Taxa					
	Cr*	Ci**	Psp*	Pp**	Vc*	So**
ASA1	+		+	+	+	
ASA2	+		+		+	
ASA3	+		+	+	+	
ASA4	+		+	+	+	+
ASA5	+	+	+	+	+	+
ASA6	+	+	+	+	+	
ASA7	+	+	+	+	+	+
ASA8	+		+	+	+	
ASA9	+	+	+	+	+	+

Al analizar las secuencias mediante alineamientos, se determinó que todas las proteínas ASA presentan un porcentaje de identidad de más del 50% con las respectivas proteínas ASA de *C. reinhardtii*. La proteína ASA 8 fue la que presentó el mayor porcentaje de identidad (aproximadamente 80%), por lo que se diseñaron oligonucleótidos para tratar de amplificar un fragmento del gen *asa8* a partir de los DNAs de las algas previamente seleccionadas. Solamente se obtuvo un producto de 237 pb a partir del DNA de *C. reinhardtii* (aislado UTEX 1062) que fue clonado y secuenciado (Figura 18).

```

Cr*  -ILGEAYLKDILRPPPTGFMPENVAHPYQKSFYTYATKKLFPRHWFLLAGFTFTITLYGTLDLSLRDAGKKKAYDEAVLAGNH-----
Cr   MTLGEAYLKDILRPPPTGFMPENVAHPYQKSFYTYATKKLFPRHWFLLAGFTFTITLYGTLDLSLRDAGKKKAYDEAVLAGKQFFTAGGH
Psp  MVLGEVYLLKDI LRTPPTGAIPANVHPFQT SFYTYATKKLI PRHWYLLGGFTFTITLYGI LDGLRDSGKKKAYDEA IHAGKT PYTAGGH
Vc   MTLGEAYLKDILRPPPTGFMPENVAHPYQKSFYTYATKKLFPRHWFLLAGFTFTITLYGTLDLSLRDAGKKKAYDEAVLAGKQE-----
  
```

Figura 18. Alineamiento de ASA8. Los aminoácidos que son idénticos están resaltados en gris oscuro y los aminoácidos que son equivalentes están resaltados en gris claro. Cr*, *C. reinhardtii* (UTEX 1062); Cr, *C. reinhardtii*; Psp, *Polytomella* sp.; Vc, *V. carteri*.

Discusión

Transferencia del gen *cox2* al núcleo: completo y fragmentado

La transferencia de genes mitocondriales al genoma nuclear se ha relacionado con ventajas selectivas como: liberación de los efectos del trinquete de Muller (*i.e.* la acumulación de mutaciones deletéreas en poblaciones asexuales debido a la ausencia de recombinación) (Martin 1998) y el ambiente libre de radicales libres que ofrece el núcleo (*i.e.* menos mutaciones) (Allen 1996). No obstante, se ha reportado que la tasa de mutación en los organelos de las plantas es menor que en el genoma nuclear (Palmer 2000). Por otro lado, recientemente se ha sugerido que una de las principales consecuencias del evento de endosimbiosis que dio lugar a la generación de la mitocondria, fue una reestructuración de la distribución física del DNA en relación con las membranas bioenergéticas. Esto permitió una expansión en el número de genes expresados gracias a una mayor capacidad energética (Lane 2010). Lo anterior apoya en términos bioenergéticos un genoma nuclear de mayor tamaño.

Actualmente, se desconoce el mecanismo mediante el cual los genes mitocondriales son transferidos al genoma nuclear. La teoría más aceptada es que la transferencia ocurre mediante intermediarios de RNA, *i.e.* mediante transcripción reversa (Adams 2003), de tal manera que en un momento determinado existe una copia del gen en el genoma mitocondrial y otra en el genoma nuclear. Para que la transferencia de un gen sea exitosa, se requiere de una serie de cambios que favorezcan su correcta activación, expresión y regulación en el núcleo, e incluyen: la adquisición de un promotor, de una señal de poliadenilación y de una presecuencia de localización mitocondrial (Adams 2003). Aunque también se ha observado en plantas que algunos genes mitocondriales que han sido transferidos al genoma nuclear contienen una señal de localización mitocondrial intrínseca y constitutiva (Ueda 2008). En teoría, después de la activación del gen transferido, ambas copias del gen se expresan de manera transitoria, seguidas de la inactivación de uno de los dos genes (Adams 1999, Adams 2003). La inactivación se lleva a cabo por mutaciones a nivel de DNA (*i.e.* en exones o intrones y alteran el marco de lectura); a nivel de RNA (*i.e.* en elementos regulatorios que alteran la expresión); o a nivel de DNA y RNA (*i.e.* generan pseudogenes) (Adams 1999).

La citocromo *c* oxidasa o complejo IV, es la última enzima de la cadena respiratoria. La proteína COXII de éste complejo, codificada por el gen *cox2*, es un componente esencial que contiene el centro binuclear Cu_A. Éste capta los electrones donados por las moléculas de citocromo *c*, iniciando el flujo de electrones que culmina en la reducción del oxígeno. Así, la proteína COXII tiene un papel central en el metabolismo aeróbico.

El gen *cox2* está generalmente presente en el genoma mitocondrial de los eucariontes, sin embargo, en las legumbres se localiza en el genoma nuclear. Adams et al., (Adams 1999, Adams 2002) llevaron a cabo un análisis para detectar en 25 géneros de legumbres la presencia del gen *cox2* en el genoma mitocondrial o nuclear, así como su expresión. Los autores encontraron los siguientes casos: (1) presencia del gen en el genoma mitocondrial y su expresión; (2) presencia del gen en ambos genomas y expresión solamente del gen mitocondrial; (3) presencia del gen en ambos genomas y expresión de ambos genes; y (4) presencia del gen en el genoma nuclear y su expresión. Los casos 2 y 3 reflejan la coexistencia del mismo gen en ambos genomas, pero con expresión diferencial. Los autores concluyen que la inactivación del gen *cox2* ha ocurrido múltiples veces de manera aleatoria e independiente en las legumbres; por lo que su localización, ya sea en el genoma mitocondrial o nuclear, no confiere ninguna ventaja selectiva en plantas. La distribución de genes *cox2* en el núcleo y en la mitocondria de legumbres también demuestra que la migración de genes de la mitocondria al núcleo es un proceso evolutivo que aún no concluye.

Modelo de la fragmentación y transferencia del gen *cox2* al núcleo en algas clorofíceas

Además de las algas clorofíceas, existe otro caso en el que el gen *cox2* está fragmentado en dos genes: los apicomplejos. Éstos se caracterizan por contener una estructura denominada apicoplasto, que es un plástido vestigial cuyo origen se ha atribuido a un segundo evento de endosimbiosis con un organismo eucarionte fotosintético, es decir, un alga (Waller 1998). El grupo de los apicomplejos presenta un gen *cox2* fragmentado en dos genes nucleares: *cox2a* y *cox2b* (Funes 2002b). El análisis de las secuencias correspondientes de tres apicomplejos reveló que: (1) ambos genes están fragmentados en la misma posición que los genes *cox2a* y *cox2b* de las clorofíceas; (2) los polipéptidos codificados por ambos genes presentan extensiones C-terminales y N-terminales, respectivamente; (3) el gen *cox2a* contiene un intron homólogo al del gen *cox2a* de *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp. Incluso, cuando los autores compararon las secuencias en un contexto filogenético, el grupo de los apicomplejos y las clorofíceas aparecen como grupos hermanos. Basándose en la evidencia anterior, los autores propusieron un origen común para las algas clorofíceas y los apicomplejos.

Existen varios ejemplos de genes fragmentados que codifican proteínas que pertenecen a diferentes complejos de la cadena respiratoria. El protista *Acanthamoeba castellanii* presenta el gen *cox1* fragmentado en dos genes: uno nuclear que codifica la porción C-terminal de la proteína COXI ortodoxa y otro mitocondrial que codifica la porción N-terminal de la proteína COXI ortodoxa (Gawryluk 2010). En *Euglena gracilis* (Gawryluk 2009) y en el apicomplejo *T. cruzi* (Morales 2009) el gen *sdhB* está fragmentado en dos genes nucleares: *sdhB-n* y *sdhB-c* que codifican la porción N-terminal y C-terminal de la subunidad SDHB que contiene los centros Fe-S de transferencia de electrones de la succinato deshidrogenasa o complejo II.

Incluso, en *E. gracilis* los polipéptidos expresados por ambos genes contienen secuencias equivalentes a las extensiones C- y N-terminales descritas para COXIIA y COXIIB, respectivamente, de clorofíceas (Gawryluk 2009). Finalmente, el ejemplo más radical es el del flagelado *Diplonema papillatum* (Vlcek 2010). Su genoma mitocondrial entero consiste en más de nueve cromosomas circulares donde todos los genes (*i.e.* *cob*, *cox1-3*, *atp6*, *nad1*, 4, 5, 7 y 8) están fragmentados hasta en nueve segmentos. Cada segmento se transcribe de manera independiente y mediante el proceso de edición en *trans*, cada segmento se incorpora en una sola molécula de mRNA.

En la actualidad se desconoce por qué y cómo se fragmentan los genes que codifican una sola proteína. En este trabajo se propone el siguiente modelo para explicar la fragmentación y transferencia del gen *cox2* mitocondrial en las algas clorofíceas (Figura 19) y parte de la presencia del gen *cox2b* nuclear en todas las algas clorofíceas.

El modelo propone que las algas clorofíceas ancestrales contenían el gen *cox2* intacto y localizado en el genoma mitocondrial (Figura 19 paso 1). Sin embargo, una inserción de origen desconocido invadió al gen *cox2* sin alterar su marco de lectura (Figura 19 paso 2). Eventualmente, la inserción se perdió, pero dejó un gen *cox2* fragmentado en los genes *cox2a* y *cox2b* y además dejó secuencias remanentes que corresponden a las extensiones C- y N-terminales actuales (Figura 19 paso 3). Una explicación alternativa a la inserción, es la de suponer eventos de recombinación que dieron lugar a la fragmentación del gen, de manera semejante a lo que ocurrió con la fragmentación de genes que codifican para RNAs ribosomales en las algas verdes (Nedelcu 1997, Nedelcu 1998). Posteriormente, el gen *cox2b* se transfirió al genoma nuclear y en algunos casos fue invadido por intrones, mientras que el gen *cox2a* permaneció en el genoma mitocondrial (Figura 19 paso 4). Se ha sugerido que el gen *cox2a* permanece en el genoma mitocondrial debido a un cambio en el código genético (Nedelcu 2000, Pérez-Martínez 2001). Finalmente, el gen *cox2a* se transfirió al genoma nuclear, adquirió los elementos necesarios para su expresión y regulación, y en algunos casos fue invadido por intrones (Figura 19 paso 5).

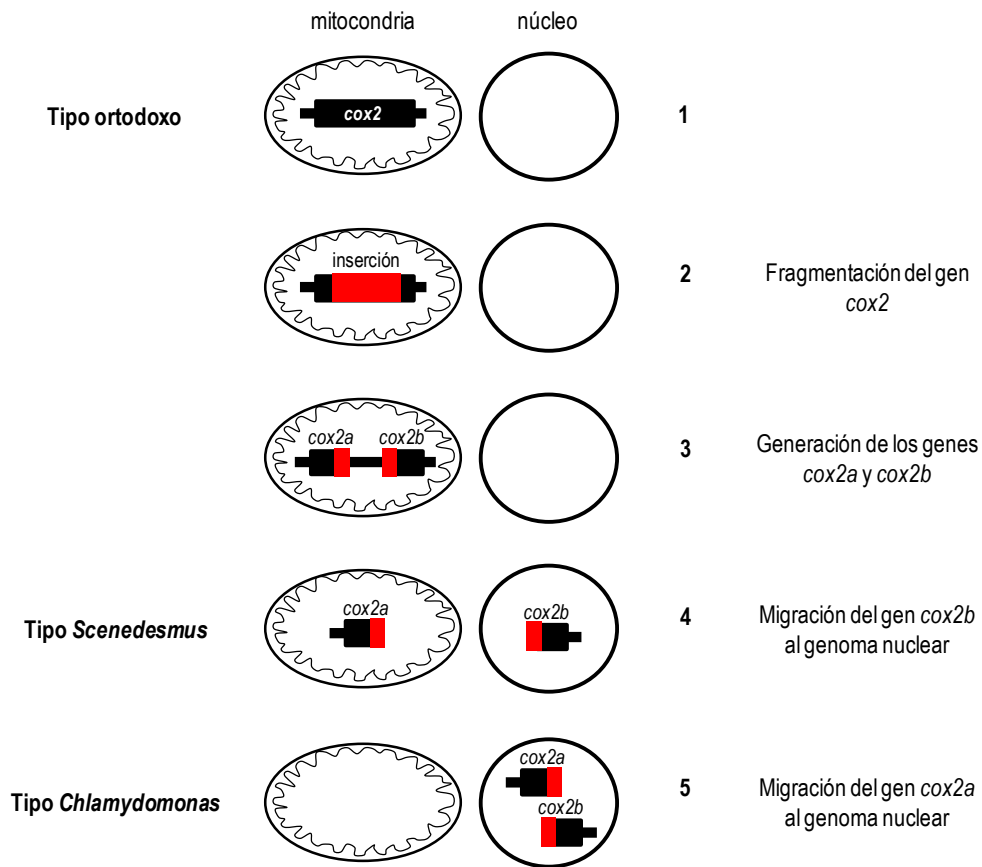


Figura 19. Fragmentación y transferencia del gen *cox2* mitocondrial. Secuencia hipotética de eventos de la fragmentación del gen *cox2* mitocondrial. Cada paso se describe detalladamente en el texto. El gen *cox2* y sus respectivos fragmentos se indican en negro. Los remanentes de la inserción se indican en rojo. A la izquierda se indica el tipo de alga clorofícea que corresponde a la distribución del gen *cox2* o de los genes *cox2a* y *cox2b* que se muestran a la derecha.

Evidencias que apoyan al modelo

Las evidencias que se proponen para sustentar este modelo se describen a continuación. La primera, es que en la actualidad existen algas clorofíceas con genes *cox2* con diferente estructura (*i.e.* intacto o fragmentado) y diferente localización (*i.e.* mitocondrial o nuclear). El gen *cox2* intacto mitocondrial que se observa en las algas prasinofíceas, ulvofíceas y trebouxiofíceas y que está representado en el tipo ortodoxo, coincide con la distribución de *cox2* inferida para el ancestro de las clorofíceas. Además, esto coincide también con el hecho de que estudios filogenéticos consideran a las clorofíceas como un grupo monofilético, pero hermano con respecto a las ulvofíceas y trebouxiofíceas, y parafilético con respecto a las prasinofíceas (Stewart 1975, van den Hoek 1995, Nakayama 1998, Lewis 2004, Pröschold 2007).

La segunda, consiste en la inserción que se ha encontrado en el gen *cox2* de un grupo de organismos no relacionados con las algas verdes. En algunas algas cafés que constituyen el phylum *Phaeophyceae*, *Pylaiella littoralis* (NP_150411), *Laminaria digitata* (NP_659277), *Desmarestia viridis* (YP_448665), *Fucus vesiculosus* (YP_448626), *Saccharina coriacea* (YP_003288877) y *Ectocarpus siliculosus* (CBJ18021) se ha encontrado mediante análisis computacional (resultados no publicados) que el gen *cox2* mitocondrial contiene una inserción. Ésta tienen un tamaño entre 2352 y 3063 pb, y comparte un alto grado de similitud entre las algas cafés. Además, la inserción se localiza en la misma posición en relación con la fragmentación del gen *cox2* ortodoxo de clorofíceas. El origen de la inserción se desconoce y no se han encontrado homólogos hasta el momento. Estos resultados sugieren que dicha región del gen *cox2* podría ser susceptible a alteraciones en diferentes organismos.

La tercera, consiste en los remanentes que ha dejado la inserción: las extensiones C-terminales y N-terminales de los genes *cox2a* y *cox2b*, respectivamente. El análisis de éstas extensiones (Figura 16) reveló que éstas comparten un alto grado de similitud, lo cual podría sugerir que la invasión del gen *cox2* por una inserción fue un evento exitoso que ocurrió una sola vez a lo largo de la historia evolutiva de las algas clorofíceas. Hasta el momento, no se han encontrado homólogos en ninguna base de datos para estas extensiones. El hecho de que otros genes fragmentados también presenten extensiones de diferente longitud (*i.e.* *sdhB-n* y *sdhB-c* de *E. gracilis*, y *cox2a* y *cox2b* de apicomplejos), independientemente de su localización, podría apoyar la hipótesis de que éstas son remanentes de la inserción.

El análisis de las MTS disponibles del gen *cox2a* nuclear (Figura 15 A) reveló que éstas comparten un alto grado de similitud. Esto sugiere que el evento de transferencia del gen *cox2* al núcleo y de la adquisición de una MTS también fue un evento exitoso que ocurrió una sola vez a lo largo de la historia evolutiva de las algas clorofíceas. Además, el análisis filogenético apoya esta hipótesis. Al comparar la MTS de *cox2a* con la MTS de *cox2* nuclear de legumbres, se observan que éstas se agrupan dos grupos independientes (Figura 15 B).

Finalmente, la fragmentación de genes tiene implicaciones importantes a nivel celular, metabólico y evolutivo. Dada la función esencial que desempeña la subunidad COXII en la cadena respiratoria, resulta sorprendente que las algas hayan podido sobrevivir a la fragmentación del gen *cox2*. Probablemente, el metabolismo desempeñó un papel crítico en el proceso. Por ejemplo, *C. reinhardtii* presenta una gran plasticidad metabólica: es un alga heterótrofa, pero también autótrofa facultativa; así como aeróbica y anaeróbica facultativa (Funes 2007). Esta plasticidad metabólica seguramente ha tenido un papel importante en la colonización de una amplia gama de hábitats. La mayoría de las algas son organismos acuáticos de vida libre que habitan aguas dulces, salobres o saladas (Margullis 1990). Otras son epífitas (Lüttge 2010), epizóicas (Garbary 2007), parásitas (de Koning 2006) o endosimbióticas (Nishihara 1998, Lewis 2004b,

Kerney 2011). Las clorofíceas habitan en nichos ecológicos que cambian constantemente o en condiciones extremas, como la nieve (Mosser 1977), el desierto (Cardon 2008), o halitos (Lowenstein 2011), donde permanecen largos períodos en estado de desecación. Se ha demostrado que algunas algas pueden sobrevivir hasta 35 años en un estado de desecación en condiciones de laboratorio (Trainor 1995), o incluso de millones de años en halitos (Lowenstein 2011).

El gen *cox2* como marcador molecular en algas clorofíceas

La filogenia de las algas verdes está en constante revisión ya que hasta ahora no se ha encontrado un carácter (o una combinación de caracteres) morfológico, ultraestructural o genético que sea lo suficientemente informativo y excluyente. Los caracteres comúnmente utilizados no han permitido esclarecer partes de la historia evolutiva de las algas clorofíceas en las que se hipotetiza ocurrieron numerosas radiaciones en un periodo corto de tiempo que generaron una gran diversidad. Las propiedades de los genomas tales como estructura, composición, organización y contenido de genes podrían ser una herramienta útil para estudiar y esclarecer la historia evolutiva de las algas verdes. Sobre todo si se considera que la taxonomía actual se basa en un conjunto de caracteres morfológicos que están determinados por uno o varios genes.

Aunque la clasificación taxonómica basada en la orientación del cuerpo ha demostrado ser en gran medida congruente con caracteres celulares o ultraestructurales, no siempre es representativa de cada uno de los diferentes grupos de algas verdes (Moestrup 1978, Mattox 1984). Estudios filogenéticos recientes se han basados en caracteres moleculares: (1) rRNAs (Buchheim 1996, Pröschold 2007, Nakada 2008), (2) espaciadores internos del cistron ribosomal (Fabry 1999, Keller 2008), (3) genes de cloroplasto (Buchheim 1996, Turmel 2008), y (4) genomas completos de mitocondria o cloroplasto (Nedelcu 2000, Pombert 2004, Turmel 2010). Con respecto a la clase *Chlorophyceae*, el principal desafío actual consiste en que los diferentes marcadores moleculares frecuentemente proporcionan diferentes resoluciones topológicas, por lo que aún falta una visión coherente de las relaciones filogenéticas de las algas clorofíceas (Pröschold 2001, Shoup 2003, Nakada 2008, Turmel 2010).

La estructura del genoma y el contenido de genes de los genomas de organelos pueden superar algunos de los problemas encontrados con los marcadores moleculares tradicionales; por ejemplo, debido a la densidad de genes relativamente alta y al contenido de genes de copia única que presentan (Pröschold 2001, Brouard 2010). La fragmentación de genes es un evento molecular relativamente raro, por lo que los genes fragmentados se consideran marcadores moleculares útiles (Pérez-Martínez 2001, Adams 2002, Gawryluk 2009). El gen *cox2* como marcador molecular: es representativo, es un gen constitutivo de las algas verdes; es discreto, está o no fragmentado; su localización varía (*i.e.* mitocondrial, mitocondrial-nuclear o nuclear);

presenta variación a nivel de secuencia, pero conserva aminoácidos característicos que corresponden a cada opción de localización (Figura 14); y es heredable de manera vertical. Sin embargo, la región utilizada en este estudio es muy pequeña, aproximadamente entre 200 a 300 pb. Para estudios posteriores será conveniente contemplar abarcar una longitud mayor, de preferencia que considere los genes completos (*i.e.* las MTS y las extensiones), así como considerar un muestreo de taxa que sea más amplio.

Las células móviles de las algas comprendidas en los cinco órdenes de la clase *Chlorophyceae* presentan diferentes características estructurales y ultraestructurales. Las algas pertenecientes al orden Chlamydomonadales son normalmente biflageladas y los cuerpos basales presentan una estructura CW. Las algas pertenecientes al orden Sphaeropleales y Chaetopeltidales son normalmente biflageladas o cuadriflageladas, respectivamente, y los cuerpos basales presentan una estructura DO. Las algas pertenecientes al orden Chaetophorales son normalmente cuadriflageladas y presentan un arreglo polimórfico de los cuerpos basales: un par tiene una estructura CW y el otro una estructura DO. Finalmente, las algas pertenecientes al orden Oedogoniales no se pueden clasificar con base en este sistema ya que poseen un anillo de flagelos (O'Kelly 1983, Lewis 2004, Turmel 2010). El análisis de 18S indica que los órdenes Chlamydomonadales y Sphaeropleales (clado CS) son monofiléticos divergentes, mientras que la relación entre los órdenes Oedogoniales, Chaetopeltidales y Chaetophorales (clado OCC) aún no está bien resuelta (Nakayama 1998, Lewis 2004). Los análisis de los genomas de cloroplastos también sugieren la división de la clase *Chlorophyceae* en dos grandes grupos: clado CS y el clado OCC (Shoup 2003, Müller 2004, Turmel 2010).

La diversidad de las algas clorofíceas observada en este trabajo (*i.e.* tipo-*Scenedesmus* o tipo-*Chlamydomonas*) revela una asociación entre la fragmentación y localización del gen *cox2* y la orientación del cuerpo basal del flagelo (Figura 20). Primero, se observa que las algas pertenecientes a las clases *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae* que exhiben un gen *cox2* ortodoxo, tienen una orientación CCW. En cambio, todas las algas pertenecientes a la clase *Chlorophyceae* exhiben un gen *cox2* fragmentado y de acuerdo a la localización de los genes fragmentados, se dividen en dos grupos. El primero, el grupo tipo-*Scenedesmus* que presentan un gen *cox2a* mitocondrial y un gen *cox2b* nuclear, comprende a las algas del orden Sphaeropleales, cuyos miembros presentan una configuración DO. Asimismo, las algas analizadas que pertenecen al orden Chaetophorales y que presentan una configuración DO, exhiben también un gen *cox2a* mitocondrial. El segundo grupo, el tipo-*Chlamydomonas* comprende a las algas del orden Chlamydomonadales, cuyos miembros presentan genes *cox2a* y *cox2b* nucleares y presentan una configuración CW.

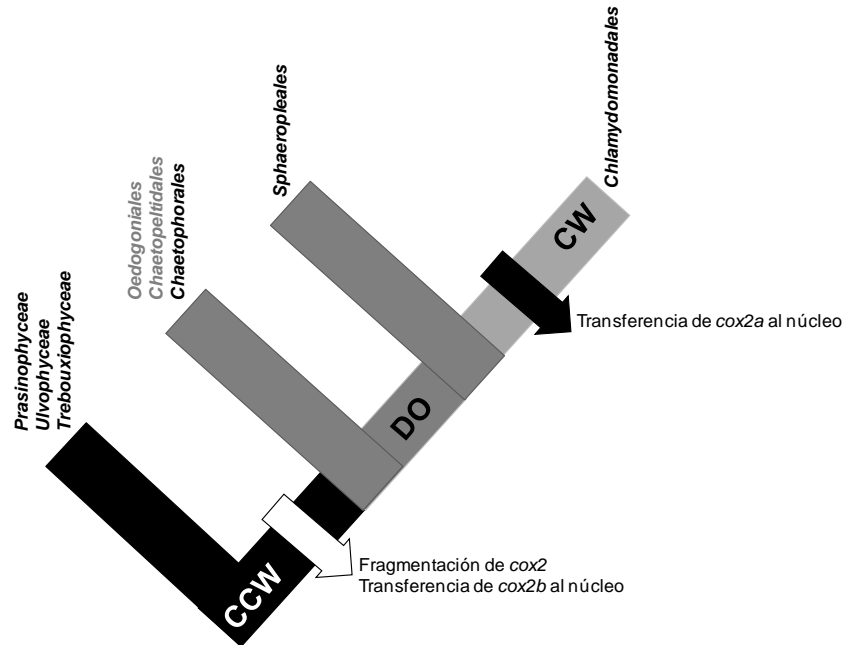


Figura 22. Cladograma que ilustra la asociación entre tipos de clorofíceas, configuración del cuerpo basal del flagelo y orden taxonómico. El posicionamiento de los órdenes Oedogoniales y Chaetopeltidales es hipotético. CCW, orientación en contra de las manecillas del reloj; DO, orientación directamente opuesta; y CW, orientación en el sentido de las manecillas del reloj.

Identificación de proteínas ASA

Los datos moleculares obtenidos, con respecto a las subunidades ASA de clorofitas, solamente incluyen al orden Chlamydomonadales, y parcialmente al Sphaeropleales (Lapille 2010). Aún se desconoce si los órdenes Oedogoniales, Chaetophorales y Chaetopeltidales contienen subunidades ASA. Las subunidades ASA de algas del orden Chlamydomonadales están bien caracterizadas (Vázquez-Acevedo 2006, Cano-Estrada 2010). Así, la presencia de subunidades ASA en *C. incerta* y *P. parva*, sugiere que éstas contienen todas las subunidades ASA. En el caso de *S. obliquus*, perteneciente al orden Sphaeropleales, solamente se identificaron fragmentos de las subunidades ASA 4, 5, 7, y 9; aun se desconoce si las demás subunidades ASA están presentes.

En el laboratorio se llevaron a cabo ensayos de PCR para tratar de amplificar un fragmento correspondiente a ASA 4 o ASA 8, a partir de los DNAs disponibles. Se eligieron las subunidades 4 y 8, dado que fueron las que mayor similitud presentaron (resultados no mostrados). Sin embargo, no se pudo obtener ningún amplificado (excepto con *C. smithii*, ver sección de Resultados, Identificación de proteínas ASA). Esto puede deberse a problemas en la estandarización de las condiciones de PCR; o, probablemente, a problemas

con el diseño de oligonucleótidos. Éstos fueron diseñados a partir de las secuencias conocidas de ASA 4 y ASA 8, sin embargo, es posible que las secuencias de estas subunidades en las demás algas analizadas sea diferente, y por lo tanto, los oligonucleótidos diseñados hayan sido incapaces de amplificarlas.

Conclusiones

- Las clases *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae* y *Trebouxiophyceae* contienen genes *cox2* ortodoxos: intactos y mitocondriales.
- Todas las algas de la clase *Chlorophyceae* que fueron analizadas presentan el gen *cox2* fragmentado en dos genes: *cox2a* y *cox2b*.
- Con base en la localización de estos genes las algas pertenecientes a la clase *Chlorophyceae* se pueden dividir en dos grupos. El primero consiste en las algas que contienen un gen *cox2a* mitocondrial y un gen *cox2b* nuclear; reciben el nombre de “tipo Scenedesmus.” El segundo consiste en las algas que contienen ambos genes, *cox2a* y *cox2b* nucleares; reciben el nombre de “tipo Chlamydomonas.”
- El modelo que se presenta se basa en la fragmentación del gen mitocondrial *cox2* y su la subsecuente migración, de manera independiente y secuencial, de los genes resultantes *cox2a* y *cox2b* al genoma nuclear en las algas de la clase *Chlorophyceae*.
- Las algas “tipo Scenedesmus” presentan una configuración “DO” y las algas “tipo Chlamydomonas” presentan una configuración tipo “CCW.”
- Solamente las algas de la clase *Chlorophyceae* presentan subunidades ASA, tanto las algas “tipo Scenedesmus” como las “tipo Chlamydomonas.”

Los estudios de genómica comparada de algas verdes proporcionarán una herramienta que permitirá realizar análisis a nivel global de los genomas. Asimismo, contribuirán a entender cuáles son las fuerzas evolutivas que afectan a los genomas; y por lo tanto, ayudarán a comprender la dinámica adaptativa. También, serán la base para llevar a cabo análisis filogenéticos más representativos y a gran escala. No obstante, este campo de la genómica apenas empieza, actualmente se dispone de pocos genomas de algas verdes secuenciados.

Perspectivas

Otro objetivo de este trabajo, consistió en determinar si la presencia del gen *cox2* fragmentado coincide con la presencia de subunidades ASA. Esta relación se estableció basándose en que las clorofíceas han experimentado grandes alteraciones a nivel genómico durante su historia evolutiva, probablemente durante las numerosas radiaciones evolutivas. Por cuestiones de tiempo, no se obtuvieron amplificadores de genes que codifican a las subunidades ASA de varias algas. El estudio se limitó a la búsqueda de secuencias en los repositorios de datos. Las subunidades ASA solamente se han encontrado en algas clorofíceas que tienen el gen *cox2* fragmentado: *C. reinhardtii*, *C. incerta*, *Polytomella* sp., *P. parva*, *S. obliquus* y *V. carteri* (Lapaille 2010). Será interesante en un futuro: (1) ampliar el muestreo, incluyendo un mayor número de géneros de algas verdes, (2) determinar si todas las algas anteriores presentan el juego completo de ASAs 1 a 9 (Tabla 9), y (3) si la presencia del gen *cox2* fragmentado coincide con la presencia de subunidades ASA en las algas clorofíceas.

Bibliografía

1. Adams KL, Ong HC, Palmer JD. 2001. Mitochondrial gene transfer in pieces: fission of the ribosomal protein gene *rpl2* and partial or complete gene transfer to the nucleus. *Mol Biol Evol.* 18: 2289-97
2. Adams KL, Palmer JD. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol.* 29: 380-95
3. Adams KL, Qiu YL, Stoutemyer M, Palmer JD. 2002. Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(15): 9905-12
4. Adams KL, Song K, Roessler PG, Nugent JM, Doyle JL, Doyle JJ, Palmer JD. 1999. Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(24): 13863-8
5. Allen JF, Raven JA. 1996. Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J Mol Evol.* 42(5): 482-92
6. Archibald JM. 2009. Green Evolution, Green Revolution. *Science.* 324(5924): 191-92
7. Baldauf SL. 2008. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J Syst Evol.* 46(3): 263-73
8. Belanger AS, Brouard JS, Charlebois P, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2006. Distinctive architecture of the chloroplast genome in the chlorophycean green alga *Stigeoclonium helveticum*. *Mol Genet Genomics.* 276(5): 464-77
9. Bhattacharya D, Medlin L. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol.* 116: 9-15
10. Brouard JS, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2008. Chloroplast DNA sequence of the green alga *Oedogonium cardiacum* (Chlorophyceae): Unique genome architecture, derived characters shared with the Chaetophorales and novel genes acquired through horizontal transfer. *BMC Genomics* 9: 290
11. Brouard JS, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2010. The exceptionally large chloroplast genome of the green alga *Floydiella terrestris* illuminates the evolutionary history of the Chlorophyceae. *Genome Biol Evol.* 2: 240-56
12. Buchheim MA, Lemieux C, Otis C, Gutell RR, Chapman RL, Turmel M. 1996. Phylogeny of the Chlamydomonadales (Chlorophyceae): a comparison of ribosomal RNA gene sequences from the nucleus and the chloroplast. *Mol Phylogenet Evol.* 5(2): 391-402
13. Buick R. 1992. The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. *Science.* 255(5040): 74-77
14. Cano-Estrada A, Vázquez-Acevedo M, Villavicencio-Queijeiro A, Figueroa-Martínez F, Miranda-Astudillo H, Cordeiro Y, Mignaco JA, Foguel D, Cardol P, Lapaille M, Remacle C, Wilkens S, González-Halphen D. 2010. Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta.* 1797(8): 1439-48
15. Cardon ZG, Gray DW, Lewis LA. 2008. The green algal underground: evolutionary secrets of desert cells. *BioScience.* 58(2): 114-22
16. Cavalier-Smith T, Brasier M, Embley TM. 2006. Introduction: how and when did microbes change the world? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1470): 845-50
17. Curtis H, Barnes NS. 1993. *Biología*. Editorial Panamericana S. A. 468-79
18. de Cambiaire JC, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2006. The complete chloroplast genome sequence of the chlorophycean green alga *Scenedesmus obliquus* reveals a compact gene organization and a biased distribution of genes on the two DNA strands. *BMC Evol Biol* 6:37
19. de Koning AP, Keeling PJ. 2006. The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured. *BMC Biol.* 4: 12
20. Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlo YN, DasGupta J, Tyryshkin A. 2001. The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(5): 2170-75
21. DOE JGI: Department Of Energy Joint Genome Institute. <http://genome.jgi-psf.org/>
22. Figueroa-Martínez F, Funes S, Franzén LG, González-Halphen D. 2008. Reconstructing the mitochondrial protein import machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics.* 179(1): 149-55
23. Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, González-Halphen D. 2002. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 277: 6051-58
24. Funes S, Davidson E, Reyes-Prieto A, Magallón S, Herion P, King MP, González-Halphen D. 2002b. A green algal apicoplast ancestor. *Science.* 298(5601): 2155

25. Funes S, Franzén LG, González-Halphen D. 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* the model of choice to study mitochondria from unicellular photosynthetic organisms. *Methods Mol Biol.* 372: 137-49
26. Garbary DJ, Bourquea G, Herman TB, McNeil JA. 2007. Epizoic algae from freshwater turtles in Nova Scotia. *J Freshwater Ecol.* 22(4): 677-85
27. Gawryluk RM, Gray MW. 2009. A split and rearranged nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial succinate dehydrogenase in Euglenozoa. *BMC Res Notes* 2: 16
28. Gawryluk RM, Gray MW. 2010. An ancient fission of mitochondrial Cox1. *Mol Biol Evol.* 27(1): 7-10
29. González-Halphen D, Funes S, Pérez-Martínez X, Reyes-Prieto A, Claros MG, Davidson E, King MP. 2004. Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system. *Ann N Y Acad Sci.* 1019: 232-9
30. Gray MW, Burger G, Lang BF. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-81
31. Herron MD, Hackett JD, Aylward FO, Michod RE. 2009. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(9): 3254-58
32. Higashiyama T, Yamada T. 1991. Electrophoretic karyotyping and chromosomal gene mapping of *Chlorella*. *Nucleic Acids Res.* 19(22): 6191-5
33. Holland HD. 2006. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361: 903-15
34. Inagaki Y, Simpson AGB, Dacks JB, Roger AJ. 2004. Phylogenetic Artifacts Can be Caused by Leucine, Serine, and Arginine Codon Usage Heterogeneity: Dinoflagellate Plastid Origins as a Case Study. *Syst Biol.* 53(4): 582-93
35. Kerney R, Kim E, Hangarter RP, Heiss AA, Bishop CD, Hall BK. 2011. Intracellular invasion of green algae in a salamander host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(16): 6497-502
36. Lane N, Martin W. 2010. The energetics of genome complexity. *Nature.* 467(7318): 929-34
37. Lapaille M, Escobar-Ramírez A, Degand H, Baurain D, Rodríguez-Salinas E, Coosemans N, Boutry M, Gonzalez-Halphen D, Remacle C, Cardol P. 2010. Atypical Subunit Composition of the Chlorophycean Mitochondrial F1FO-ATP Synthase and Role of Asa7 Protein in Stability and Oligomycin Resistance of the Enzyme. *Mol Biol Evol.* 27(7):1630-1644
38. Lemieux C, Otis C, Turmel M. 2000. Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature.* 403:649-52
39. Lewis LA, McCourt RM. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot.* 91(10): 1535-56
40. Lewis LA, Muller-Parker G. 2004b. Phylogenetic placement of "zoochlorellae" (Chlorophyta), algal symbiont of the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Biol Bull.* 207(2): 87-92
41. Lowenstein TK, Schubert BA, Timofeeff MN. 2011. Microbial communities in fluid inclusions and long-term survival in halite. *GSA Today.* 21(1): 4-9
42. Lüttge U, Büdel B. 2010. Resurrection kinetics of photosynthesis in desiccation-tolerant terrestrial green algae (Chlorophyta) on tree bark. *Plant Biol (Stuttg).* 12(3): 437-44
43. Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ. 1990. *Handbook of protoctista.* Jones & Bartlett Publishers. 597-651
44. Margulis L, Schwartz KV. 1998. *Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on Earth.* W. H. Freeman and Company. 192
45. Martin W, Herrmann RG. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol.* 118(1): 9-17
46. Martin W, Müller M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature.* 392(6671):37-41
47. Mattox KR, Stewart KD. 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. In *The Systematics of the Green Algae.* Irvine DEG and John D (eds). Academic Press, NY, USA.
48. Maul JE, Lilly JW, Cui L, de Pamphilis CW, Miller W, Harris EH, Stern DB. 2002. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell.* 14(11): 2659-79
49. Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, *et al.* 2007. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science.* 318(5848): 245-50
50. Moestrup Ø. 1978. Phylogenetic validity of flagellar apparatus in green algae and other chlorophyll a and b containing plants. *Biosystems.* 10(1-2): 117-44
51. Moestrup Ø. 2001. Algal taxonomy: historical overview. *Encyclopedia of life sciences,* John Wiley and Sons, Ltd. 1-6

52. Morales J, Mogi T, Mineki S, Takashima E, Mineki R, Hirawake H, Sakamoto K, Omura S, Kita K. 2009. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. *J Biol Chem.* 284(11): 7255-63
53. Mosser JL, Mosser AG, Brock TD. 1977. Photosynthesis in the snow: the alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae). *J Phycol.* 13(1): 22-27
54. Müller T, Rahmann S, Dandekar T, Wolf M. 2004. Accurate and robust phylogeny estimation based on profile distances: a study of the Chlorophyceae (Chlorophyta). *BMC Evol Biol.* 4: 20
55. Nakada T, Misawa K, Nozaki H. 2008. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Mol Phylogenet Evol.* 48(1): 281-91
56. Nakayama T, Marin B, Kranz H D, Surek B, Hussc VAR, Inouyea I, and Melkonian M. 1998. The basal position of scaly green flagellates among the green algae (Chlorophyta) is revealed by analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Protist.* 149: 367–80
57. Nedelcu AM, Lee RW, Lemieux C, Gray MW, Burger G. 2000. The complete mitochondrial DNA sequence of *Scenedesmus obliquus* reflects an intermediate stage in the evolution of the green algal mitochondrial genome. *Genome Res.* 10: 819-31
58. Nedelcu AM, Lee RW. 1998. Short repetitive sequences in green algal mitochondrial genomes: potential roles in mitochondrial genome evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15: 690–701
59. Nelson DL, Cox MM. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry.* W. H. Freeman and Company. 707-34
60. Nishihara N, Horiike S, Takahashi T, Kosaka T, Shigenaka Y, Hosoya H. 1998. Cloning and characterization of endosymbiotic algae isolated from *Paramecium bursaria*. *Protoplasma.* 203: 91–99
61. O'Kelly CJ, Floyd GL. 1983. Flagellar apparatus absolute orientations and the phylogeny of the green algae. *Biosystems.* 16(3-4): 227-51
62. Palenik B, Grimwood J, Aerts A, Rouzé P, Salamov A, Putnam N. 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 7705-10
63. Palmer JD, Adams KL, Cho Y, Parkinson CL, Qiu YL, Song K. 2000. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(13):6960-6
64. Pérez-Martínez X, Antaramian A, Vázquez-Acevedo M, Funes S, Tolkunova E, d'Alayer J, Claros MG, Davidson E, King MP; González-Halphen D. 2001. Subunit II of cytochrome c oxidase in *Chlamydomonas* algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem.* 276: 11302-9
65. Pérez-Martínez X, Funes S, Tolkunova E, Davidson E, King MP, González-Halphen D. 2002b. Structure of nuclear-localized *cox3* genes in *Chlamydomonas reinhardtii* and in its colorless close relative *Polytomella* sp. *Curr Genet.* 40: 399-404
66. Pombert JF, Lemieux C, Turmel M. 2006. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis* reveals a distinctive quadripartite architecture in the chloroplast genome of early diverging ulvophytes. *BMC Biol* 4: 3
67. Pombert JF, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2004. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Pseudodoclonium akinetum* (Ulvophyceae) highlights distinctive evolutionary trends in the chlorophyta and suggests a sister-group relationship between the Ulvophyceae and Chlorophyceae. *Mol Biol Evol.* 21(5): 922-35
68. Pombert JF, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2005. The chloroplast genome sequence of the green alga *Pseudodoclonium akinetum* (Ulvophyceae) reveals unusual structural features and new insights into the branching order of chlorophyte lineages. *Mol Biol Evol* 22: 1903–18
69. Poole AM, Penny D. 2006. Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *BioEssays.* 29:74–84
70. Prochnik SE, Umen J, Nedelcu AM, Hallmann A, Miller SM, Nishii I, *et al.* 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science.* 329(5988): 223-26
71. Pröschold T, Leliaert F. 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics.* Edited by: Brodie J, Lewis J. London, UK: CRC Press; 123-35.
72. Pröschold T, Marin B, Schlösser UG, Melkonian M. 2001. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist.* 152(4): 265-300
73. Robbens S, Derelle E, Ferraz C, Wuyts J, Moreau H, Van de Peer Y. 2007. The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Mol Biol Evol* 24(4): 956-68

74. Rodríguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, Roure B, Burger G, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Philippe H, Lang BF. 2005. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol.* 15(14): 1325-30
75. Sagan L. 1967. On the Origin of Mitosing Cels. *J Theoret Biol.* 14: 225-74
76. Shoup S, Lewis LA. 2003. Polyphyletic origin of parallel basal bodies in swimming cells of chlorophycean green algae (Chlorophyta). *J Phycol.* 39: 789-96
77. Smith DR, Burki F, Yamada T, Grimwood J, Grigoriev IV, Van Etten JL, Keeling PJ. 2011. The GC-rich mitochondrial and plastid genomes of the green alga *Coccomyxa* give insight into the evolution of organelle DNA nucleotide landscape. *PLoS One* 6:e23624
78. Smith DR, Lee RW. 2009. The mitochondrial and plastid genomes of *Volvox carteri*: bloated molecules rich in repetitive DNA. *BMC Genomics.* 10: 132
79. Stewart KD, Mattox KR. 1975. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls A and B. *Bot Rev.* 41:104-35
80. Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W. 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet.* 5(2): 123-55
81. Trainor FR, Gladych R. 1995. Survival of algae in a desiccated soil: a 35-year study. *Phycologia.* 34(3): 191-92
82. Turmel M, Brouard JS, Gagnon C, Otis C, Lemieux C. 2008. Deep division in the Chlorophyceae (Chlorophyta) revealed by chloroplast phylogenomic analyses. *J Phycol.* 44(3): 739-50
83. Turmel M, Gagnon MC, O'Kelly CJ, Otis C, Lemieux C. 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol Biol Evol.* 26(3):631-48
84. Turmel M, Lemieux C, Burger G, Lang BF, Otis C, Plante I, Gray MW. 1999. The complete mitochondrial DNA sequences of *Nephroselmis olivacea* and *Pedinomonas minor*. Two radically different evolutionary patterns within green algae. *Plant Cell.* 11: 1717-30
85. Turmel M, Otis C, Lemieux C. 1999b. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(18): 10248-53
86. Turmel M, Otis C, Lemieux C. 2006. The chloroplast genome sequence of *Chara vulgaris* sheds new light into the closest green algal relatives of land plants. *Mol Biol Evol.* 23(6): 1324–38
87. Turmel M, Otis C, Lemieux C. 2009b. The chloroplast genomes of the green algae *Pedinomonas minor*, *Parachlorella kessleri*, and *Oocystis solitaria* reveal a shared ancestry between the Pedinomonadales and Chlorellales. *Mol Biol Evol* 26(10): 2317–31
88. Ueda M, Fujimoto M, Arimura SI, Tsutsumi N, Kadowaki KI. 2008. Presence of a latent mitochondrial targeting signal in gene on mitochondrial genome. *Mol Biol Evol.* 25(9):1791-93
89. Vahrenholz C, Riemen G, Pratje E, Dujon B, Michaelis G. 1993. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr Genet.* 24(3): 241-47
90. van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. 1995. *Algae: an introduction to phycology.* Cambridge University Press.
91. Vazquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Remacle C, Gonzalez-Halphen D. 2006. The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomembr.* 38(5-6): 271-82
92. Vinogradova E, Salinas T, Cognat V, Remacle C, Maréchal-Drouard L. 2009. Steady-state levels of imported tRNAs in *Chlamydomonas* mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages. *Nucleic Acids Res.* 37(5): 1521-28
93. Vitek C, Marande W, Teijeiro S, Lukes J, Burger G. 2011. Systematically fragmented genes in a multipartite mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 39(3): 979-88
94. Walker JE, Dickson VK. 2006. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1757(5-6): 286-96
95. Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI. 1998. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(21):12352-7
96. Watanabe KI, Ohama T. 2001. Regular spliceosomal introns are invasive in *Chlamydomonas reinhardtii*: 15 introns in the recently relocated mitochondrial *cox2* and *cox3* genes. *J Mol Evol.* 53(4-5): 333-39

97. Worden AZ, Lee JH, Mock T, Rouze P, Simmons MP, Aerts AL, *et al.* 2009. Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science*. 324(5924): 268-72
98. Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D. 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 21(5): 809-18

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympevLineage-specific fragmentation and nuclear relocation of the mitochondrial *cox2* gene in chlorophycean green algae (Chlorophyta)Elizabeth Rodríguez-Salinas^a, Héctor Riveros-Rosas^b, Zhongkui Li^{c,1}, Karolina Fučíková^d, Jerry J. Brand^c, Louise A. Lewis^d, Diego González-Halphen^{a,*}^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México^b Depto. Biología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México^c Department of Molecular Cell and Developmental Biology and Culture Collection of Algae, The University of Texas, Austin, TX 78712, USA^d Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, 75 North Eagleville Road, Storrs, 06269-3043, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 January 2012
Revised 20 March 2012
Accepted 22 March 2012
Available online 4 April 2012

Keywords:
Mitochondrial genes
Cytochrome oxidase
Chlorophyte algae
Chlorophyceae
Gene migration
Gene fragmentation

ABSTRACT

In most eukaryotes the subunit 2 of cytochrome c oxidase (COX2) is encoded in intact mitochondrial genes. Some green algae, however, exhibit split *cox2* genes (*cox2a* and *cox2b*) encoding two polypeptides (COX2A and COX2B) that form a heterodimeric COX2 subunit. Here, we analyzed the distribution of intact and split *cox2* gene sequences in 39 phylogenetically diverse green algae in phylum Chlorophyta obtained from databases (28 sequences from 22 taxa) and from new *cox2* data generated in this work (23 sequences from 18 taxa). Our results support previous observations based on a smaller number of taxa, indicating that algae in classes Prasinophyceae, Ulvophyceae, and Trebouxiophyceae contain orthodox, intact mitochondrial *cox2* genes. In contrast, all of the algae in Chlorophyceae that we examined exhibited split *cox2* genes, and could be separated into two groups: one that has a mitochondrion-localized *cox2a* gene and a nucleus-localized *cox2b* gene ("Scenedesmus-like"), and another that has both *cox2a* and *cox2b* genes in the nucleus ("Chlamydomonas-like"). The location of the split *cox2a* and *cox2b* genes was inferred using five different criteria: differences in amino acid sequences, codon usage (mitochondrial vs. nuclear), codon preference (third position frequencies), presence of nucleotide sequences encoding mitochondrial targeting sequences and presence of spliceosomal introns. Distinct green algae could be grouped according to the form of *cox2* gene they contain: intact or fragmented, mitochondrion- or nucleus-localized, and intron-containing or intron-less. We present a model describing the events that led to mitochondrial *cox2* gene fragmentation and the independent and sequential migration of *cox2a* and *cox2b* genes to the nucleus in chlorophycean green algae. We also suggest that the distribution of the different forms of the *cox2* gene provides important insights into the phylogenetic relationships among major groups of Chlorophyceae.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

After the endosymbiotic event from which mitochondria arose, a massive migration of genes to the nucleus took place (Gray et al., 1999). This process is still ongoing in some eukaryotic lineages (Bittner-Eddy et al., 1994; Adams et al., 2000; Adams and Palmer, 2003; Brandvain and Wade, 2009). Mitochondrial genomes contain a limited set of genes encoding proteins and RNAs (Gray et al.,

1999; Timmis et al., 2004). Mitochondria that possess classical components of oxidative phosphorylation (OXPHOS), i.e., the respiratory complexes I, II, III, and IV and a F₁-F₀ ATP synthase (complex V) usually contain the genes *atp6*, *atp8*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, and *nad6* in their mitochondrial DNA (mtDNA). Nevertheless, the mtDNA of several chlorophycean algae including *Chlamydomonas reinhardtii* and related species lack the genes *atp6*, *atp8*, *cox2*, *cox3*, *nad3*, and *nad4L* (Vahrenholz et al., 1993; Denovan-Wright et al., 1998; Fan and Lee, 2002). These genes are now localized in the nucleus and their protein products are synthesized in the cytosol, imported by mitochondria, and assembled into their corresponding OXPHOS complex in the inner mitochondrial membrane (Pérez-Martínez et al., 2000, 2001; Funes et al., 2002b; Cardol et al., 2006).

Mitochondrial *cox2* encodes the cytochrome oxidase subunit that contains the binuclear center Cu_A which is instrumental for cytochrome c oxidase activity (Tsukihara et al., 1996). Mitochon-

* Corresponding author. Address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, Delegación Coyacán, 04510 México D.F., México. Fax: +52 55 5622 5611.

E-mail addresses: erodo@biomedicas.unam.mx (E. Rodríguez-Salinas), hriveros@servidor.unam.mx (H. Riveros-Rosas), jbrand@mail.utexas.edu (J. Brand), louise.lewis@uconn.edu (L.A. Lewis), dhalphen@ic.unam.mx (D. González-Halphen).

¹ Present address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA.

drial genes that migrate to the nucleus usually do so as an intact entity. In several lineages of legumes, for example, *cox2* is located in the nucleus and its corresponding protein synthesized in the cytosol (Adams et al., 1999). Nevertheless, migration of split genes also occurs (Pérez-Martínez et al., 2001; Adams et al., 2001; Funes et al., 2002a; Gawryluk and Gray, 2009, 2010). In several chlorophycean algae, *cox2* encoding subunit COX2 of cytochrome *c* oxidase (complex IV) is split into two genes, *cox2a* and *cox2b*. In *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp., and *Volvox carterii*, both genes are located in the nucleus (Pérez-Martínez et al., 2001; Prochnik et al., 2010), whereas in *Scenedesmus obliquus*, *cox2a* is located in the mtDNA and *cox2b* in the nucleus (Nedelcu et al., 2000; Funes et al., 2002a). The location of *cox2a* and *cox2b* in different chromosomes of *C. reinhardtii* suggests that these genes migrated independently (Merchant et al., 2007; Prochnik et al., 2010).

The gene *cox2a* encodes the COX2A polypeptide that corresponds to the amino terminal (N-) portion of a canonical COX2 subunit (the membrane-bound region), while *cox2b* encodes COX2B, the carboxy (C-) terminal portion of an orthodox COX2 subunit (Pérez-Martínez et al., 2001). Split COX2A and COX2B subunits are also characterized by unique amino acid extensions located in the C- and N-termini respectively, which are thought to stabilize the interaction between the two polypeptides in the algal cytochrome *c* oxidase complex (Pérez-Martínez et al., 2001). In addition, the precursor of COX2A exhibits a cleavable mitochondrial targeting sequence (MTS) that directs the protein to mitochondria. In contrast, COX2B lacks such a MTS. Proteins destined to the mitochondrial inner membrane may be synthesized with a cleavable MTS, whereas others are targeted to mitochondria via internal signals (Arnold et al., 1998). COX2B probably contains a yet unknown internal signal that allows its import into the mitochondrial inter-membrane space (Jiménez-Suárez et al., 2012).

Split *cox2a* and *cox2b* genes are also present in the nuclear genome of two taxa of alveolates: apicomplexan parasites (Funes et al., 2002a; Gardner et al., 2002) and dinoflagellates (Hackett et al., 2005). It has been debated whether the split genes in alveolates originated from the endosymbiosis of a green alga (Funes et al., 2002a, 2004) or from an independent event of fragmentation and migration to the nucleus (Waller and Keeling, 2006).

Here, we investigated the distribution of orthodox and split *cox2* genes in diverse green algae, with a special focus on chlorophycean algae taxa. We generated new *cox2* data and analyzed information in published databases in order to infer phylogenetic relationships within chlorophytes.

2. Materials and methods

2.1. Algae isolates and DNA amplification and sequencing

All isolates were from the Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (UTEX), except for *Polytomella* sp., which was obtained from the Sammlung von Algenkulturen (Göttingen, Germany) (Table 1 and Supplementary Table S1). Cultures were grown at 20 °C in their recommended growth medium (www.utex.org). Collected cells were washed three times with distilled water by centrifugation, and DNA obtained as described (Li and Brand, 2007). DNA concentration and purity were determined with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. Purified DNA was stored in distilled water at -80 °C. Degenerate primers were designed based on the sequences of the fragmented genes *cox2a* and *cox2b* from *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp., *S. obliquus*, and from the orthodox *cox2* genes from *Prototheca wickerhamii* and *Pseudododinium akinerum* (accession numbers shown in Supplementary Table S1). Primers were designed based on the conserved regions shown in Supplementary Fig. S1 and Supple-

mentary Table S2, considering the mitochondrial and nuclear codon usage biases of chlorophycean algae (Kazusa database: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

About 60–200 ng of DNA from cultured algae was amplified using Accuzyme Taq polymerase (Bioline USA Inc.). DNA samples were incubated at 94 °C for 5 min before each PCR reaction due to the high GC content of algal DNA. The resulting amplification products were gel purified using the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN Inc., USA) and independently cloned in the pGEM-T Easy Vector System (Promega Co., USA). All fragments were sequenced using the -20 M13 universal primer. Sequences that were longer than 200 bp were deposited in GenBank under the accession numbers indicated in Supplementary Table S1.

2.2. Sequence analysis and phylogenetic analysis

BLAST analyses (blastp or tblastn) were conducted to identify *cox2* gene sequences in chlorophytes in the following databases: GenBank, Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/>) and TBestDB (<http://amoebida.bcm.umontreal.ca/pepdb/search/welcome.php>). The corresponding amino acid sequences were inferred using the ExPASy Translate Tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Amino acid sequence alignments were performed with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Introns in the PCR products were detected with the program AUGUSTUS (<http://augustus.gobics.de>). The relative frequencies of the four nucleotides at the first, second, and third codon positions were calculated with MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) and plotted using Microsoft Excel.

Separate protein sequence alignments, corresponding to COX2A, COX2B, and concatenated COX2A-COX2B sequences were generated with MUSCLE (Edgar, 2004), and were corrected manually using BioEdit (Hall, 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) according to gapped BLASTP results. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Four methods were used to infer phylogenetic relationships: maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), minimum evolution (ME), and neighbor-joining (NJ). Jones-Taylor-Thornton amino acids substitution model using a discrete Gamma distribution with five categories (JTT+G) was selected with MEGA5 as the best fit-model, as evidenced by the lowest Bayesian Information Criterion values and corrected Akaike Information Criterion values (Posada and Buckley, 2004; Tamura et al., 2011). The gamma shape parameter value was estimated directly from the data within MEGA5. Confidence for internal branches using ML, MP, ME and NJ methods were obtained through bootstrap analysis (each 500 replicates).

3. Results

3.1. Distribution of different forms of *cox2* genes

To determine the distribution of the different forms of *cox2* genes among green algae, we designed different sets of degenerate primers that would amplify a region corresponding to an intact *cox2* gene or individual fragments of the split *cox2a* or *cox2b* genes (Supplementary Fig. S1). Since codon usage in the nuclear genome of green algae is highly biased (Vinogradova et al., 2009), two sets of degenerate primers were designed for every gene of interest, one based on the mitochondrial codon usage bias and the other based on the nuclear codon usage bias (Supplementary Table S2). Total DNA from various green algae was PCR-amplified using the different sets of primers. The corresponding amplicons were cloned and sequenced. Five different criteria were used to identify the location of each gene fragment: (i) the presence of different consensus ami-

Table 1
Fragmentation and location of *cox2* genes in Chlorophyta.

Class	Type	Taxon	Isolate	<i>cox2</i>	<i>cox2b</i>				
					Without introns	With introns	Without introns	With introns	
Prasinophyceae	Orthodox	<i>Micromonas</i> sp.	RCC299	●	–	–	–	–	
		<i>Micromonas pusilla</i>	UTEX 991	●	–	–	–		
		<i>Nephroselmis olivacea</i>	NIES-484	●	–	–	–		
		<i>Ostreococcus tauri</i>	OTTH0595	●	–	–	–		
		<i>Prasinococcus capsulatus</i>	CCMP 1194	●	–	–	–		
		<i>Pycnococcus provasili</i>	CCMP 1203	●	–	–	–		
		<i>Tetraselmis gracilis</i>	UTEX 256B	●	–	–	–		
		<i>Tetraselmis maculata</i>	Burcher	●	–	–	–		
		Ulvoiphyceae		<i>Oltmansiellopsis unicellulata</i>	CCMP 1283	●	–	–	–
				<i>Oltmansiellopsis viridis</i>	NIES 360	●	–	–	–
				<i>Pseudendoclonium alinetum</i>	UTEX 1912	●	–	–	–
Trebouxiophyceae		<i>Chlorella vulgaris</i>	UTEX 259	●	–	–	–		
		<i>Coccomyxa</i> sp.	C-169	●	–	–	–		
		<i>Helicosporidium</i> sp.	ATCC 50920	●	–	–	–		
		<i>Prothotheca wickelhamii</i>	SAG 263-11	●	–	–	–		
		<i>Prothotheca wickelhamii</i>	UTEX 1533	●	–	–	–		
		<i>Pseudotrebouxia impressa</i>	UTEX 892	●	–	–	–		
		<i>Trebouxia corticola</i>	UTEX 909	●	–	–	–		
		<i>Trebouxia jamesii</i>	UTEX 223B	●	–	–	–		
		Chlorophyceae	Scenedesmus-like	Chaetophorales	<i>Chaetophora incrassata</i>	UTEX 1289	–	●	–
<i>Stigeoclonium helveticum</i>	UTEX 441				–	●	–	ND	
Sphaeropleales	<i>Scenedesmus obliquus</i>			UTEX 78	–	●	–	–	○
	<i>Pododictella falcata</i>			UTEX 101	–	●	–	○	–
	<i>Neochloris aquatica</i>			UTEX 138	–	●	–	○	–
	<i>Planctosphaeria texensis</i>			UTEX 1241	–	●	–	ND	–
	<i>Bracteacoccus aerius</i>			UTEX 1250	–	ND	–	–	○
	<i>Bracteacoccus grandis</i>			UTEX 1246	–	ND	–	–	○
	<i>Bracteacoccus</i> sp.			UTEX 2252	–	ND	–	–	○
Chlamydomonas-like	<i>Pseudomuriella schumacherensis</i>			SAG 2137	–	ND	–	–	○
	<i>Chlamydomonas hindakii</i>			UTEX 2098	–	ND	–	○	–
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			137C	–	–	○	○	–
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			UTEX 1062	–	–	○	○	–
	<i>Chlamydomonas appianata</i>		UTEX 225	–	–	○	○	–	
	<i>Chlamydomodium starii</i>		UTEX 111	–	–	○	○	–	
	<i>Polytomella</i> sp.		SAG 198.80	–	–	○	○	–	
	<i>Volvox carterii</i>		Eve	–	–	○	○	–	
	<i>Hormotilla blehniana</i>		UTEX 1239	–	–	○	ND	–	
	<i>Chlamydomonas monadina</i>		UTEX 210	–	–	ND	○	–	
	<i>Dunalella parva</i>		UTEX 1983	–	–	ND	○	–	
	<i>Dunaliella</i> sp.		UTEX SP16	–	–	ND	○	–	
	<i>Tetracyctis aerea</i>		UTEX 1453	–	–	ND	○	–	
	<i>Chlamydomonas incepta</i>		Not specified	–	–	○*	○*	–	
	<i>Haematococcus pluvialis</i>		UTEX 2505	–	–	○*	○*	–	
	<i>Polytomella parva</i>		Not specified	–	–	○*	○*	–	
<i>Chlamydomonas moewusii</i>	SAG 12-2e		–	–	**	**	–		
<i>Dunalella salina</i>	CCAP 19/18		–	–	**	**	–		
<i>Polytomella capuana</i>	SAG 63-5		–	–	**	**	–		
<i>Polytomella</i> sp.	SAG 63-10		–	–	**	**	–		
Pedinophyceae		<i>Pedinomonas minor</i>	UTEX 1350	–	–	?	?	–	

Black circles (●) and white circles (○) indicate the presence of the specified gene in the mitochondrial or in the nuclear genome, respectively. Single asterisks (*) indicate that the data was obtained from an EST database (<http://ana.bench.bcm.umontreal.ca/ana/bench/>) and therefore the presence or absence of introns could not be determined. Double asterisks (**) suggest the presence of *cox2a* and *cox2b* genes within the nuclear genome, since they are not present in their corresponding mitochondrial genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33090&org=organelle>). (ND) Stands for non-determined and indicates the inferred location of the indicated gene. (–) Indicates that no amplification product was obtained in the PCR. (?) Question mark in Pedinophyceae stands for the possibility that *cox2* may have been transferred as two independent genes or as a single entity (see text).

no acid sequences characteristic of either mitochondrion- or nucleus-encoded COX2A and COX2B chlorophytean proteins (Supplementary Fig. S2); (ii) differences in codon usage inferred from the primer set that successfully amplified the gene fragment (mitochondrial vs. nuclear primers); (iii) third position frequencies in the genes (Fig. 1); (iv) the presence of MTS in some of the genes

that migrated to the nucleus (Supplementary Fig. S3a); and (v) the presence of splicing introns in some nucleus-localized genes (Supplementary Fig. S4). Table 1 lists the analyzed algae and indicates the characteristics and location of the *cox2* gene inferred from the PCR sequences: intact or fragmented, mitochondrial or nuclear, intron-containing or intron-less. Supplementary

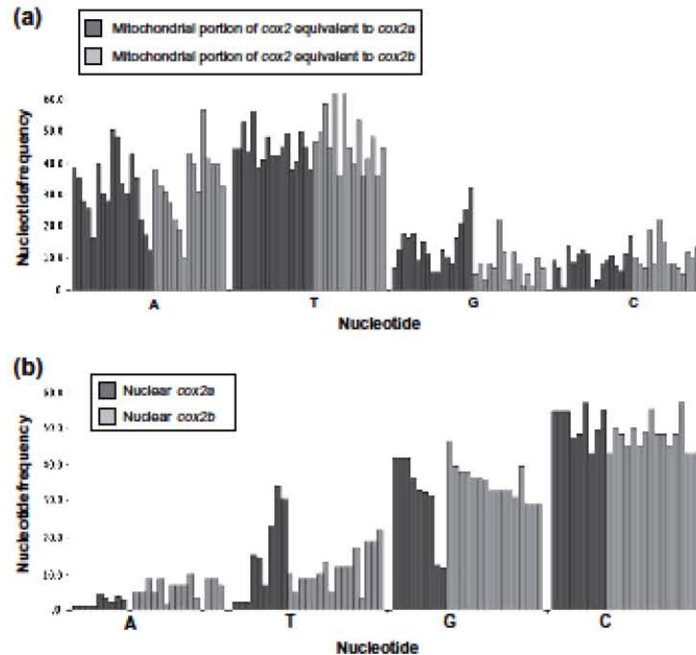


Fig. 1. Nucleotide preference in the third codon position. Nucleotide frequency for each sequence is plotted for each nucleotide that appears in the third codon position for: (a) The portion of mitochondrial *cox2* genes equivalent to *cox2a* (dark grey) are shown for species in the following order: *N. olivacea*, *T. maculata*, *M. sp.*, *G. taeni*, *P. piovassilli*, *O. viridis*, *P. akinetum*, *O. unicoloratus*, *H. sp.*, *P. wickerhamii*, *P. insipida*, *C. vulgaris*, *C. incrassata*, *S. helveticum*, *P. falcata*, *S. obliquus*, *N. aquatica*. The portion of mitochondrial *cox2* genes equivalent to *cox2b* (light grey) are from *T. guizhii*, *T. maculata*, *N. olivacea*, *G. taeni*, *M. sp.*, *M. pusilla*, *P. piovassilli*, *P. akinetum*, *O. unicoloratus*, *O. viridis*, *H. sp.*, *P. wickerhamii*, *P. wickerhamii* (UTEX 1533), *P. insipida*, *C. vulgaris*. (b) The nucleus-localized *cox2a* (dark grey) gene fragments are shown in the following order: *C. applanata*, *C. reinhardtii* 137C, *C. reinhardtii* UTEX1062, *H. bionisia*, *C. saccharum*, *H. pluvialis*, *V. carterii*, *P. sp.*, *P. parva*. The nucleus-localized *cox2b* (light grey) gene fragments are from *C. lacustris*, *N. aquatica*, *C. Nodulifera*, *B. grandis*, *T. aeris*, *B. sp.*, *B. aeris*, *P. achuatarensis*, *P. falcata*, *C. saccharum*, *H. pluvialis*, *C. applanata*, *D. parva*, *D. sp.*, *C. reinhardtii* UTEX 1062, *C. monadina*.

Table S1 provides the accession numbers of all listed sequences in Table 1.

Green algae in Prasinophyceae, Trebouxiophyceae, and Ulvophyceae all exhibited orthodox mitochondrial *cox2* genes (see Table 1), as previously reported for a smaller number of sequences (Wolff et al., 1994; Turmel et al., 1999; Pombert et al., 2004, 2006; Robbins et al., 2007). In contrast, all *cox2* genes of chlorophycean algae were split.

All chlorophycean genera included in this study that exhibited a mitochondrial *cox2a* gene and a nuclear *cox2b* gene, i.e., “Scenedesmus-like”, are members of either Chaetophorales or Sphaeropleales (Table 1).

A large number of species were found to be “Chlamydomonas-like”, i.e., they exhibited both nucleus-localized *cox2a* and *cox2b* genes (Table 1). Failure to amplify any intact, mitochondrial *cox2* gene from these algae agrees with the fact that several fully-sequenced mitochondrial genomes do not show *cox2* gene remnants in their mtDNA (Denovan-Wright et al., 1998; Vahrenholz et al., 1993; Smith and Lee, 2008; Smith et al., 2010a, 2010b).

Predicted COX2A and COX2B protein sequences from fractured *cox2* were aligned with predicted COX2 proteins from intact *cox2*, and were shown to be similar. However, clear differences between the nucleus-encoded and the mitochondrion-encoded proteins were observed, and characteristic amino acid signatures for each group were identified (Supplementary Fig. S2). For example, two

signatures KIHGT and PSFAL, are present in the translated orthodox mitochondrial COX2 sequences, which are replaced by RFNHHT and PSLTL in the mitochondrion-encoded COX2A and by KLTHHT and PSLTL in the nucleus-encoded COX2A sequences. Also, the signature ERLV is present in all nucleus-encoded COX2B sequences instead of the NRVV, which is in almost all orthodox COX2 sequences. Thus, some nucleotide sequences encoding amino acid signatures changed after the fragmentation of the *cox2* gene and others were altered after migration to the nucleus occurred.

To obtain insight into the evolutionary history of fragmented *cox2* genes from Chlorophyta, phylogenetic analyses of COX2A and COX2B protein sequences were performed. Translated amino acid sequences were used to construct phylogenetic trees, to avoid possible artifacts generated by significant differences in GC content among mitochondrial genomes from chlorophycean algae (Smith et al., 2011) and codon usage heterogeneity (Inagaki et al., 2004), as significant differences exist in codon usage between mitochondrial and nuclear genes (Fig. 1). Orthodox, intact COX2 sequences were first aligned separately with COX2A (35 sequences) or COX2B (45 sequences) and a phylogenetic analysis was performed on each set of homologous proteins. All individual COX2A sequences clustered in one branch, composed only of chlorophycean algae. Within this branch, nucleus-localized *cox2a* genes are present only in Chlamydomonadales (Supplementary Fig. S5a). All COX2B se-

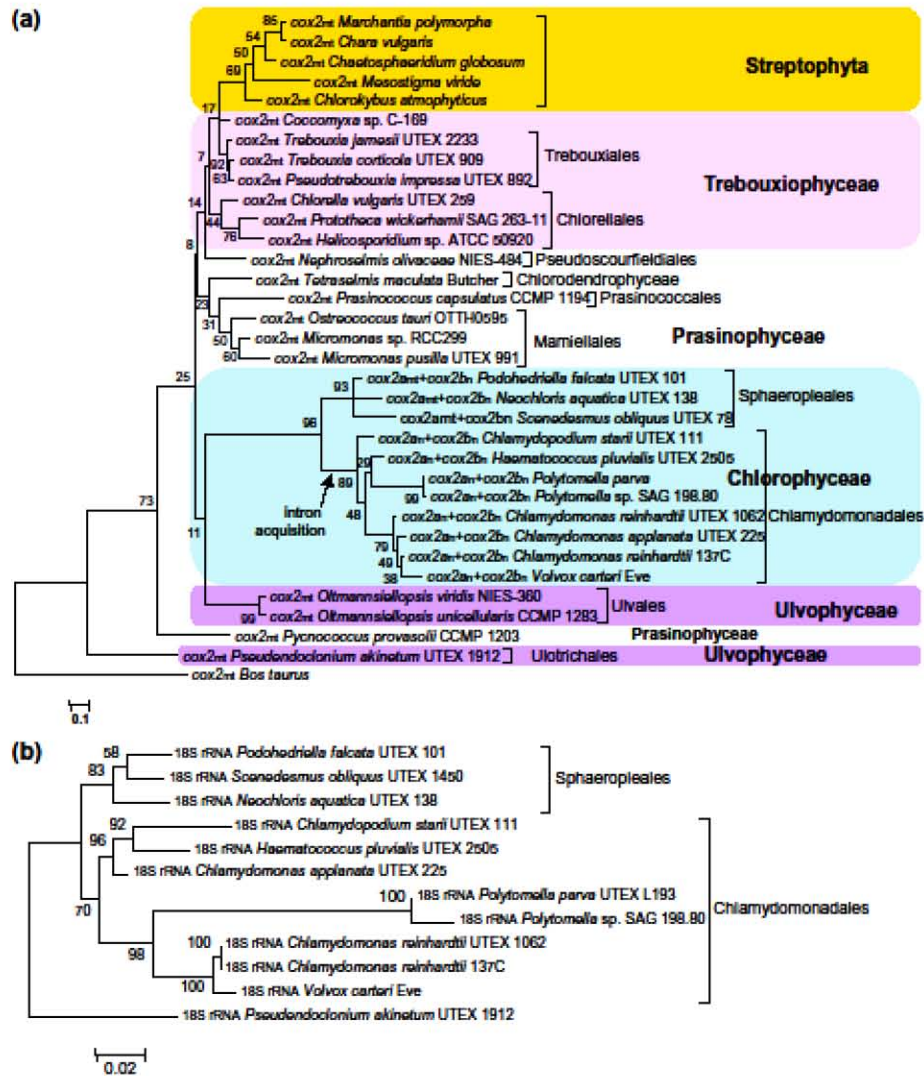


Fig. 2. Phylogenetic analysis of orthodox COX2 proteins and tandem pairs of COX2A and COX2B proteins and an 18S rDNA analysis of chlorophycean phylogeny. (a) A phylogenetic analysis was performed using pairs of concatenated COX2A-COX2B protein sequences from the same species to produce bi-domain sequences that were aligned with intact, orthodox COX2 protein sequences. The tree was inferred from 500 replicates, using the Maximum Likelihood method based on the Jones-Taylor-Thornton matrix-based model. The best tree with the highest log likelihood (-3586.3982) is shown. Similar trees were obtained with MP, ME and NJ methods. The analysis involved 34 amino acid sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 130 positions in the final dataset. Trees were rooted with COX2 from *Bos taurus* and five streptophyte species were included as an external group. Putative intron acquisition in the *cox2a* gene is indicated with an arrow. (b) Evolutionary history of chlorophycean algae, based on 18S rDNA gene sequences, was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The best tree with the highest log likelihood (-5660.7386) is shown. The analysis involved 12 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 1865 positions in the final dataset. The tree was rooted with 18S rDNA from *Pseudodictyonium alkinatum* UTEX 1912. In both trees branches are drawn to scale, with the bar length indicating the number of substitutions per site. The proportion of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) is shown next to the branches.

quences also clustered in one branch, but in contrast to *cox2a*, all analyzed chlorophycean algae exhibit nucleus-localized *cox2b* genes (Supplementary Fig. S5b). Concatenated COX2A-COX2B sequences were aligned with orthodox, intact COX2 sequences and

the phylogenetic analysis was repeated using the Maximum Likelihood method to improve bootstrapping scores (Fig. 2a). Distribution of the COX2 sequences within the resulting phylogenetic tree is similar to that of previously described trees (Supplementary

Fig. S5), and is also similar to phylogenetic trees constructed with 18S rRNA or concatenated chloroplast protein-coding genes (Präschold and Leliaert, 2007; Nakada et al., 2008; Turmel et al., 2008). Thus, all fragmented COX2 sequences are grouped in one branch composed by chlorophycean algae, supporting the hypothesis of their common origin. Fig. 2b shows a phylogenetic tree constructed with 18S rRNA sequences from chlorophycean algae included in Fig. 2a. The distribution of COX2 and 18S rRNA sequences is practically identical in both trees.

Analysis of codon third position frequencies of *cox2* fragments revealed notable differences (Fig. 1). Gene fragments exhibited a preference for either A/T or G/C nucleotides in the third position, which corresponded to their mitochondrial or nuclear location, respectively. This codon usage bias is sufficient to establish unambiguously if the gene is mitochondrion- or nucleus-localized.

The available sequences of the C-terminal extensions of COX2A and the N-terminal extensions of COX2B were also aligned (Supplementary Figs. S3b and S3c). The alignments show similarity among these sequences in *C. reinhardtii*, *H. pluvialis*, *Polytomella* sp., *S. obliquus* and *V. carteri*. These extensions could be remnants of an original intrusive insertion or of the recombination event that resulted in the initial split *cox2*.

Long MTS ranging from 100 to 140 residues are characteristic of several proteins of OXPHOS that are encoded in genes that migrated from the mitochondrion to the nucleus in chlorophycean algae, except for COX2B (González-Halphen et al., 2004; Figueroa-Martínez et al., 2008). Nucleus-located *cox2a* genes encode long MTS in *C. reinhardtii*, *C. incerta*, *D. salina*, *H. pluvialis*, *Polytomella* sp., *P. parva*, and *V. carteri*, that direct their corresponding protein products to the mitochondrion. Mitochondrial *cox2* genes do not encode presequences, except the 15-residues sequence of *Saccharomyces cerevisiae* (Herrmann et al., 1995). The primers used in this work, designed to amplify a region between conserved sequences, did not allow us to characterize the MTS, so only those encoded in *cox2a* genes that have been completely sequenced could be analyzed. Sequence alignment of all known MTS clearly show that they are highly conserved, suggesting their common origin (Supplementary Fig. S3a). In legumes, an intact *cox2* gene migrated from the mitochondria to the nucleus (Nugent and Palmer, 1991; Adams et al., 1999), and in some of these legumes the *cox2* gene was lost from the mitochondrial genome. Thus, nuclear *cox2* genes in legumes acquired independently of chlorophycean algae the region encoding a MTS. Furthermore, in addition to the intact mitochondrion-located *cox2* gene, a nucleus-located *cox2* gene occurs in chromosome 17 of the prasinophycean alga *Ostreococcus tauri* (accession number: XP_003083974). The nuclear *cox2* from *O. tauri* possesses a region encoding a MTS and two introns (data not shown). However, it is not clear if this intact *cox2* gene is functional, since there is no experimental evidence of its expression, its sequence has not been completely assembled, and it is absent in the nuclear genome of the close relative *O. lucimarinus*. To corroborate that the MTS of legumes and chlorophycean algae result from different nuclear migration events, an alignment of nuclear *cox2* and *cox2a* MTS sequences was performed, and a maximum likelihood tree was constructed. As shown in Supplementary Fig. S3d, the phylogenetic analysis clearly separates the MTS from nucleus-encoded COX2 proteins of legumes from the nucleus-encoded COX2A proteins of algae, and from the MTS from *O. tauri* COX2, indicating independent migration of mitochondrial *cox2* genes to the nucleus in these lineages.

3.2. Intron invasion in the nucleus-localized *cox2a* and *cox2b* genes of chlorophycean algae

Intron invasion of nucleus-localized genes is a widespread phenomenon in green algae (Watanabe and Ohama, 2001). When the

PCR-amplification products of *cox2a* and *cox2b* genes from several algae were translated, a series of stop codons that disrupt the reading frame were observed. In all, 17 sequences that resembled spliceosomal introns could be identified, 12 in *cox2a* sequences and five in *cox2b* sequences (Supplementary Fig. S4). An intron ranging in size from 113 to 664 bp was found in the same position in the *cox2a* sequences from *Chlamydomonas reinhardtii* 137C, *C. reinhardtii* UTEX1062 (formerly known as *C. smithii*), *C. applanata*, *Chlamydomodium starii*, *Hormotila blennista*, *Polytomella* sp. and *Volvox carteri*. Further downstream, a second intron ranging in size from 124 to 295 bp, was found in the same position in *cox2a* sequences from *C. reinhardtii* 137C, *C. reinhardtii* UTEX1062, *C. applanata*, *C. starii*, and *V. carteri*. Only the introns present in *C. reinhardtii* 137C, *C. reinhardtii* UTEX1062, and *C. applanata* were clearly homologous (data not shown).

An intron of 160 bp was found in the *cox2b* gene of *Pseudomonilla schumacherensis*. Further downstream, an intron ranging in length from 134 to 299 bp was found in the *cox2b* sequences from *Bracteacoccus grandis*, *B. aerius*, and *B. sp.* An intron of 299 bp in that same position was previously reported for *S. obliquus* (Winkler and Kuck, 1991; Funes et al., 2002a). Only *B. grandis* and *Bracteacoccus* sp. introns in *cox2b* gene fragments were clearly homologous (data not shown).

The first intron of *C. applanata* and *C. reinhardtii* UTEX1062 *cox2a* gene fragments, the second intron of the *C. starii* *cox2a* gene fragment, and the intron of the *S. obliquus* *cox2b* gene fragment contain the putative branching site CTGGC, typical of self-splicing introns and essential for the splicing process. The second intron of *C. applanata* and *C. reinhardtii* UTEX1062 *cox2a* gene fragments, and the intron of the *P. schumacherensis* *cox2b* gene fragment contain the putative branching site GTCAC. The first intron of the *V. carteri* *cox2a* gene fragment and the intron of the *B. grandis* *cox2b* gene fragment contain the putative branching sequence CTGAC. The intron of *Bracteacoccus* sp. and *B. aerius* *cox2b* gene fragments contain the putative branching sequence CTGAA. All of these putative branching sites have been reported previously in chlorophycean introns (Watanabe and Ohama, 2001; Pérez-Martínez et al., 2002). All introns contain putative donor (5'GT) and acceptor (3'AG) sites. Although introns are known to be present in some mitochondrial genes, the presence of spliceosomal introns in these particular *cox2a* and *cox2b* genes suggests they are nucleus-localized.

4. Discussion

4.1. Distribution of *cox2* genes among Chlorophyceae

Disrupting mitochondrial *cox2*, whose product is essential for cytochrome *c* oxidase viability and therefore for respiration, would have a high probability of lethality. Therefore, we suggest that fragmentation of the mitochondrial *cox2* gene and subsequent relocation of one or both of the fragments to the nucleus happened only once in the evolutionary history of green algae, in the common ancestor of all extant members of the lineage Chlorophyceae. The observed distribution of fragmented *cox2* genes in chlorophycean algae is similar to the distribution obtained by analyses of 18S rRNA sequences (Fig. 2), further supporting a vertical inheritance.

Following fragmentation and independent migration to the nucleus, the resulting *cox2a* and *cox2b* genes underwent additional modifications in order to become functional in the new cellular compartment. Among other things, they gained promoter sequences, modified their codon usage, some of them acquired nucleotide sequences encoding MTS (*cox2a* but not *cox2b*), they gained polyadenylation signals, and in several cases they were invaded by spliceosomal introns (González-Halphen et al., 2004).

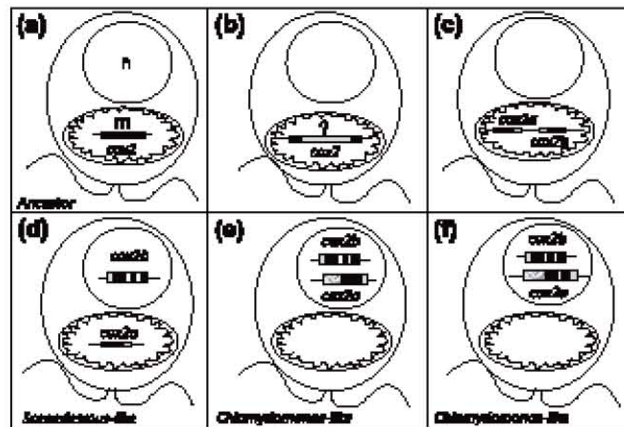


Fig. 3. Model of *cox2* gene fragmentation and migration to the nucleus in chlorophycean algae. Panels “a” to “f” illustrate the events that led to mitochondrial *cox2* gene fragmentation and the independent and sequential migration of the resulting split genes to the nucleus. Details of each step are described in Section 4.2. Genes encoding intact or split *cox2* genes are shown in black, the putative sequence insertion and its corresponding remnants after fragmentation are shown in light gray, the region encoding a MTS is shown in dark gray, and introns are depicted in white. The question mark in panel “b” refers to two possible mechanisms of *cox2* gene fragmentation, either through recombination events or through an insertional event.

Split *cox2a* and *cox2b* genes of *S. obliquus*, *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. encode unique C-terminal and N-terminal extensions. These extensions have been hypothesized to interact during the assembly of COX2A and COX2B subunits in the cytochrome *c* oxidase complex (Pérez-Martínez et al., 2001). They are present in the sequences of COX2A and COX2B proteins of *C. reinhardtii*, *C. incerta*, *P. parva*, *Polytomella* sp., *D. salina*, *H. pluvialis*, *V. carteri* (nucleus-encoded *cox2a* and *cox2b*), and *S. obliquus* (mitochondrion-encoded *cox2a* and nucleus-encoded *cox2b*) (Supplementary Figs. S3b and S3c). The homology of these extensions suggests a single event of insertion or recombination in the original mitochondrial *cox2* gene that caused its fragmentation, rather than an independent split of the *cox2* gene in different algal lineages.

The mitochondrial genome of *Scenedesmus obliquus* (NC_002254) was reported to contain an atypical *cox2* gene (Nedelcu et al., 2000), which was later shown to be the mitochondrion-localized *cox2a* fragment of a split *cox2* gene, with its corresponding nucleus-localized *cox2b* portion (Funes et al., 2002a). Comparing the size and gene content of the mitochondrial genome of *S. obliquus* with those of other green algae sequenced at the time, it was suggested that the *cox2* gene structure found in *S. obliquus* (a member of Sphaeropleales, Chlorophyceae) represents an intermediate step leading to the form of *cox2* seen in *Chlamydomonas*. It was proposed that algae such as *S. obliquus* retained more genes than *Chlamydomonas* in its mitochondrial genome due to modifications in the genetic code that restricted further gene migration to the nucleus (Nedelcu et al., 2000). Our work indicates that the *S. obliquus* form of the *cox2* gene is much more widespread in green algae, being present in all studied members of Sphaeropleales and Chaetophorales (see Table 1, “*Scenedesmus-like*” group). Therefore, modifications in the mitochondrial genetic code may have restricted further migration of *cox2a* to the nucleus in these lineages. The rest of the chlorophycean algae that we studied, members of Chlamydomonadales, possess the “*Chlamydomonas-like*” architecture, i.e., they exhibited split, nucleus-localized *cox2a* and *cox2b* genes showing no traces of *cox2* genes in their mtDNA, as originally described for *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. (Pérez-Martínez et al., 2001).

We were unable to find any examples of chlorophycean algae with intact mitochondrial *cox2* genes. Also, none had both *cox2a* and *cox2b* in their mitochondrial genomes. Given the presence of a nuclear *cox2b* gene in all Chlorophyceae, it is most probable that the *cox2b* gene migrated to the nucleus very soon, on an evolutionary time scale, after the *cox2* gene fragmentation event. The algae that we included in this work may not represent the entire genetic diversity of the *cox2* gene within Chlorophyceae, as some orders were omitted from this study (e.g. Oedogoniales and Chaetophorales).

The presence of introns in the nuclear genes of green algae is a useful tool to determine phylogenetic relationships (Liss et al., 1997; Nozaki et al., 2002). Nucleus-encoded *cox2* and *cox3* genes of *C. reinhardtii* have been previously reported to contain spliceosomal introns (Watanabe and Ohama, 2001; Pérez-Martínez et al., 2002). This study revealed additional introns that interrupt nucleus-localized split *cox2* genes of some chlorophycean algae. The spliceosomal nature of the identified introns indicates that intron invasion postdated migration of mitochondrial genes to the nucleus. The presence of similar introns in the same positions of homologous genes, further supports their vertical inheritance.

4.2. A model for the origin of split mitochondrial *cox2* genes and their independent migration to the nucleus

We have integrated the data obtained in this work into a model for the evolutionary history of *cox2* genes among Chlorophyceae (Fig. 3). We propose that the common ancestor of the chlorophycean lineage contained an orthodox, intact mitochondrial *cox2* gene, like all opisthokonts, embryophytes and as observed for many green algae (Fig. 3a). A member of this ancestral population underwent a DNA recombination event or an insertion that divided the *cox2* gene in two regions (Fig. 3b). The accumulation of GC-rich short repetitive sequences in the mitochondrial genome of algae related to *Chlamydomonas* has led to fragmentation and scrambling of ribosomal-RNA coding regions and other gene rearrangements (Nedelcu, 1997; Nedelcu and Lee, 1998). A similar recombination event may have caused *cox2* fragmentation. Alter-

natively, an insertion that did not disturb the viability and function of the corresponding COX2 protein could have divided the original *cox2* gene in two regions. Insertions of several base pairs that divide the gene in two regions equivalent to *cox2a* and *cox2b* have been reported in several Phaeophyceae (brown algae) (Oudot-Le Secq et al., 2001, 2006). Subsequent partial removal of a similar insertion may have led to the physical separation of *cox2a* and *cox2b*, that bear sequence remnants of the intrusive insertion in their respective 3' and 5' ends (Fig. 3c). These remnant sequences encode the unique C-terminal extension of COX2A and the N-terminal extension of COX2B of chlorophycean algae. Alternatively, the *cox2* fragments could have originated from a recombination event mediated by short repeated sequences (Fig. 3b). In this scenario, the extensions could be remnants of the regions involved in these gene rearrangements. Soon after the mitochondrial *cox2* gene split, the newly-formed *cox2b* gene migrated to the nucleus (Fig. 3d). In some descendants, the mitochondrial *cox2a* gene also relocated to the nucleus (Fig. 3e). In those descendants where migration of both *cox2a* and *cox2b* occurred, the remaining mitochondrial copy of the *cox2a* gene was inactivated and eventually completely eliminated (Fig. 3e). The model assumes that for every migration step, the mitochondrial and the nuclear copies of the gene coexisted, and both were functional for a limited time (not shown in Fig. 3 for the sake of simplicity). Once the *cox2a* and *cox2b* genes relocated to separate nuclear chromosomes, some of them were invaded by type 2 splicing introns (Fig. 3f). The model is in accordance with the existence of two main separate lineages within present-day Chlorophyceae, according to the form of split *cox2* gene they may contain: (i) the *Scenedesmus*-like group (observed in members of the orders Sphaeropleales and Chaetophorales), in which the *cox2b* gene migrated to the nucleus but the *cox2a* gene was retained in the mtDNA, and (ii) the "Chlamydomonas-like" group (observed in all members of Chlamydomonadales) that lacks a *cox2* gene in its mtDNA and exhibits distinct nucleus-localized *cox2a* and *cox2b* genes.

4.3. The study of *cox2* gene distribution among Chlorophyceae provides new insights into the evolutionary history of this lineage

The phylum Chlorophyta – a monophyletic lineage within Viridiplantae – has four major taxa: a paraphyletic grade denominated Prasinophyceae (Nakayama et al., 1998), and three clades: Ulvophyceae, Trebouxiophyceae and Chlorophyceae (Lewis and McCourt, 2004; Pröschold and Leliaert, 2007), whose relationships remain subject to debate (Bhattacharya and Medlin, 1998; Pombert et al., 2004; Brouard et al., 2010). Traditionally, green algae have been classified according to morphological (Fritsch, 1935, 1945; Smith, 1950) and ultrastructural features (Moestrup, 1978; Mattox and Stewart, 1984; Stewart and Mattox, 1975). The advent of molecular markers such as nuclear-encoded rRNAs (Buchheim et al., 1996, 2001; Booton et al., 1998b; Pröschold et al., 2001; Nozaki et al., 2003; Shoup and Lewis, 2003; Müller et al., 2004; Alberghina et al., 2006; Pröschold and Leliaert, 2007; Nakada et al., 2008;), the ribosomal cistron internal transcribed spacers (Fabry et al., 1999; Keller et al., 2008), chloroplast genes (Buchheim et al., 1996; Turmel et al., 2008; Brouard et al., 2010), and whole plastid genomes (Nedelcu et al., 2000; Pombert et al., 2004; Brouard et al., 2010), corroborated much of the broad-scale ultrastructure-based classification, and provided resolution for groups of algae with similar ultrastructural features (Lewis and McCourt, 2004). The main challenge is that different molecular markers have often provided different topological resolutions, so that a coherent view of the phylogenetic relationships among the chlorophycean lineages is still emerging (Pröschold et al., 2001; Shoup and Lewis, 2003; Nakada et al., 2008; Brouard et al., 2010).

The working classification of Chlorophyceae consists of five orders: Chlamydomonadales, Sphaeropleales, Chaetophorales, Chaetopeltidales and Oedogoniales on the basis of the basal body orientation of their motile cells (Booton et al., 1998a). Algae in Chlamydomonadales and Sphaeropleales are largely biflagellate, Chaetophorales and Chaetopeltidales are quadriflagellate, and members of Oedogoniales have numerous flagella arranged in an anterior ring. Members of Chlamydomonadales exhibit a basal body clockwise configuration (CW), whereas members of Sphaeropleales and Chaetopeltidales exhibit a directly opposed configuration (DO), and Chaetophorales exhibit both configurations, [some species in the CW orientation and some in a DO configuration (O'Kelly and Floyd, 1983)]. Analysis of 18S rDNA (Nakayama et al., 1996) indicate that Chlamydomonadales and Sphaeropleales are monophyletic divergent lineages while the phylogenetic relationships among Oedogoniales, Chaetopeltidales and Chaetophorales (OCC clade) are poorly resolved. Analyses of chloroplast genomes suggest a division of Chlorophyceae into two major groups: the CS clade and the OCC clade (Shoup and Lewis, 2003; Müller et al., 2004; Turmel et al., 2008; Brouard et al., 2010). The diversity of *cox2* gene structure observed in this work allows further clarification of chlorophycean systematics by distinguishing lineages that exhibit "Scenedesmus-like" and "Chlamydomonas-like" gene locations and organizations. The former comprises the orders Sphaeropleales and Chaetophorales, and the latter comprises only Chlamydomonadales. Given the previous phylogenetic hypotheses from chloroplast genome data (e.g. Turmel et al., 2008; Brouard et al., 2010) we present a hypothesis of *cox2* evolution in green algae (Fig. 4). In this hypothesis, the ancestral condition for green plants (Viridiplantae) is the orthodox *cox2*. In the common ancestor of extant Chlorophyceae there was a major architectural change, the splitting of the *cox2* gene and subsequent migration of the *cox2b* subunit to the nucleus. Further modification of *cox2b* and the migration of *cox2a* to the nucleus occurred in the common ancestor to extant Chlamydomonadales. Given this phylogenetic hypothesis, we predict that members of the Chaetopelti-

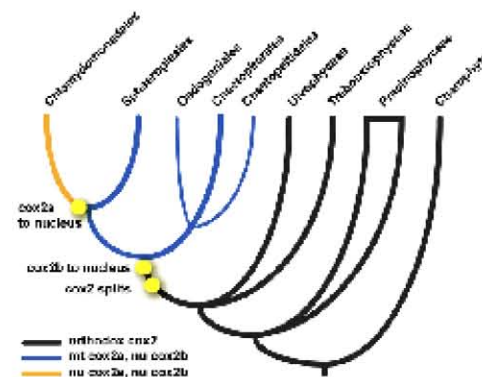


Fig. 4. Hypothesis for the timing of major structural changes in the *cox2* gene of green algae. Phylogenetic relationships of green algae are based on chloroplast genome data (after Turmel et al., 2008; Brouard et al., 2010) and show the major lineages of the phylum Chlorophyta and its sister phylum Charophyta. Most lineages of green algae have an orthodox *cox2* gene (depicted by black lines). All chlorophycean algae have a modified *cox2*, including a *nu-cox2b*, thus the common ancestor of these algae must have already possessed a split *cox2* (blue lines). All chlorophycean algae also possess a *nu-cox2a* gene (yellow lines). Thick lines represent the major taxonomic groups for which the structure of the *cox2* gene is known, and thin lines represent conditions predicted from the phylogeny.

dales and Oedogoniales will share the *cox2* architecture found in Chaetophorales, as members of these orders are united into one evolutionary lineage based on chloroplast genome information. Nevertheless, until more information is obtained, we cannot discard the possibility of an independent *cox2a* migration to the nucleus in these lineages. Furthermore, when considering evolution of the flagellar basal body orientation in these algae, the hypothesis presented here indicates that the Chlamydomonadales is more derived, supporting the idea (Turmel et al., 2008; Brouard et al., 2010) that the DO basal body absolute orientation is ancestral to the CW form among algae possessing biflagellate motile cells.

To date, the only information available on the *cox2* of Pedinophyceae is the absence of this gene in the mitochondrial genome of *Pedinomonas minor* (Turmel et al., 1999). It is tempting to speculate that in this lineage *cox2* also migrated to the nucleus as two independent genes, nevertheless, the formal possibility exists that it may have migrated as an intact entity, as in the case of legumes (Adams et al., 1999).

The origin of Chlorophyceae may be traced back approximately 600 million years ago, based on estimated divergence times calibrated with fossils (Herron et al., 2009). The origin of this lineage correlates with dramatic changes in the mitochondrial genome, including a drastic reduction in its size due to migration of mitochondrial genes to the nucleus, genome linearization, and gene fragmentation. These changes seem to be related to the loss of *atp* genes from the mtDNA and to the appearance of nucleus-encoded atypical subunits in the mitochondrial ATP synthase (complex V) (Cardol et al., 2005; Lapaille et al., 2010). In the "Scenedesmus-like" lineage, migration of mitochondrial genes to the nucleus was probably interrupted by changes in the mitochondrial genetic code (Nedelcu et al., 2000), while in the "Chlamydomonas-like" lineage, gene migration to the nucleus continued (i.e., transfer of *atp6*, *atp8*, *cox2*, *cox3*, *nad3*, and *nad4L* genes) giving rise to extremely gene-poor mitochondrial genomes. The distinction of these groups is in accordance with an earlier suggestion of the existence of three distinctive evolutionary patterns in green algae (Turmel et al., 1999; Nedelcu et al., 2000): the "ancestral" form (minimally derived) that would correspond to algae containing orthodox mitochondrial genes; a "reduced-derived pattern" corresponding to the "Chlamydomonas-like" group; and an "intermediate" pattern in the "Scenedesmus-like" group.

The results obtained in this study allow for some general assumptions and predictions: (i) All chlorophycean algae contain split *cox2* genes. (ii) All chlorophycean algae contain nucleus-localized *cox2b* genes. (iii) The multicellular families Goniatocaceae (*Gonium* and *Astrorhombium* genus) and Volvocaceae (*Volvox*, *Pandorina*, *Eudorina* and *Pleodorina*) have nucleus-localized split *cox2* genes. (iv) All nucleus-localized *cox2a* genes contain similar sequences encoding large MTSs. Indeed, if exceptions to these predictions can be found, they will be extremely useful in determining the order of appearance of the different clades of chlorophycean algae. Although not fully explored in this work, but crucial if *cox2* is to be used as molecular marker, is information regarding its genetic variability. Such data will be helpful in determining phylogenetic relationships on a finer scale (i.e., among and within the members of the different families or clades of chlorophycean algae).

Eventually, the increasing number of green algae nuclear (http://genome.jgi-psf.org) and organellar genomes that are being sequenced (Robbens et al., 2007; Merchant et al., 2007; Worden et al., 2009) will allow the reconstruction of a more coherent picture of the green algal phylogeny by comparative genomic studies. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes) (Fan and Lee, 2002; Reyes-Prieto et al., 2006). In the meantime, we suggest that the distribution of the different forms of the *cox2* gene is a novel, powerful molecular tool for distinguishing phylogenetic relationships among Chlorophyceae, because of its vertical inheritance, structure

(complete vs. fragmented), location (mitochondrion-encoded vs. nucleus-encoded) and insertional events (intronless vs. intron-containing).

Acknowledgments

We dedicate this work to Professor David W. Krogmann (Purdue University), whose encouragement and support over many years led to this collaborative research. The authors acknowledge the technical expertise of Miriam Vázquez-Acevedo. We thank Laura Ongay Larios, Minerva Mora Cabrera and Guadalupe Códiz Huerta of the Molecular Biology Unit, IFC, UNAM for primer synthesis and sequencing. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of ER-S (CONACYT 203465) and was partially funded by grants CONACYT 128110 and DGAPA UNAM IN203311-3 to DG-H; DGAPA UNAM IN208510 to HR-R; USA NSF Grants DEB-0529737 and DEB-1036448 to LL; and USA NSF Grant DBI-0650677 to JJB.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.014>.

References

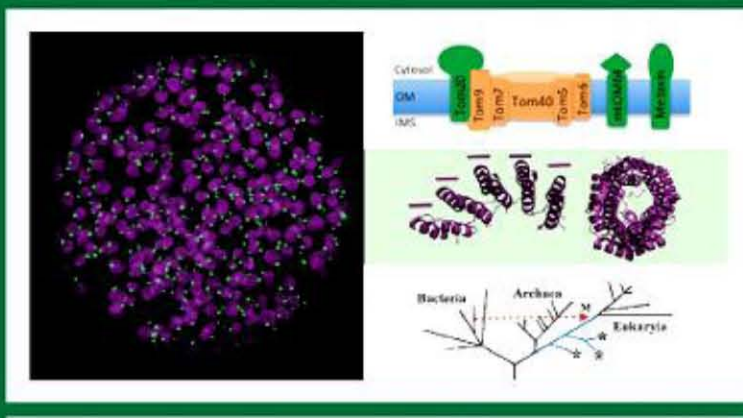
- Adams, K.L., Daley, D.O., Qiu, Y.L., Whelan, J., Palmer, J.D., 2000. Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature* 408, 354–357.
- Adams, K.L., Ong, H.C., Palmer, J.D., 2001. Mitochondrial gene transfer in pieces: fission of the ribosomal protein gene *rpl2* and partial or complete gene transfer to the nucleus. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2289–2297.
- Adams, K.L., Palmer, J.D., 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 380–395.
- Adams, K.L., Song, K., Roessler, P.G., Nugent, J.M., Doyle, J.L., Doyle, J.J., Palmer, J.D., 1999. Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencing of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13863–13868.
- Alberghina, J.S., Vigna, M.S., Confalonieri, V.A., 2006. Phylogenetic position of the Oedogoniales within the green algae (Chlorophyta) and the evolution of the absolute orientation of the flagellar apparatus. *Pl. Syst. Evol.* 261, 151–163.
- Arnold, I., Rutsch, H., Neupert, W., Stuart, R.A., 1998. Two distinct and independent mitochondrial targeting signals function in the sorting of an inner membrane protein, cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* 273, 1469–1476.
- Bhattacharya, D., Medlin, L., 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol.* 116, 9–15.
- Bitner-Eddy, P., Monroy, A.F., Brambl, R., 1994. Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa*. *J. Mol. Biol.* 235, 881–897.
- Boomon, G.C., Floyd, G.L., Frazer, P.A., 1998a. Polyphyly of tetrasporalean green algae inferred from nuclear small-subunit ribosomal DNA. *J. Phycol.* 34, 305–311.
- Boomon, G.C., Floyd, G.L., Frazer, P.A., 1998b. Origins and affinities of the filamentous green algal orders Chaetophorales and Oedogoniales based on 18S rDNA gene sequences. *J. Phycol.* 34, 312–318.
- Brandvain, Y., Wade, M.J., 2009. The functional transfer of genes from the mitochondria to the nucleus: the effects of selection, mutation, population size and rate of self-fertilization. *Genetics* 182, 1120–1139.
- Brouard, J.S., Otis, C., Lemieux, C., Turmel, M., 2010. The exceptionally large chloroplast genome of the green alga *Rhodospira rubra* illuminates the evolutionary history of the Chlorophyceae. *Genome Biol. Evol.* 2, 240–256.
- Buchheim, M.A., Lemieux, C., Otis, C., Guillet, R.R., Chapman, R.L., Turmel, M., 1996. Phylogeny of the Chlamydomonadales (Chlorophyceae): a comparison of ribosomal RNA gene sequences from the nucleus and the chloroplast. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 391–402.
- Buchheim, M.A., Michalopoulos, E.A., Buchheim, J.A., 2001. Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18S and 26S rDNA data. *J. Phycol.* 37, 819–835.
- Cardol, P., González-Halphen, D., Reyes-Prieto, A., Baurain, D., Matagne, R.F., Remacle, C., 2005. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project Plant Physiol. 137, 447–459.
- Cardol, P., Lapaille, M., Miner, P., Franck, F., Matagne, R.F., Remacle, C., 2006. ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme. *Biochem. Cell.* 5, 1460–1467.
- Derovan-Wright, E.M., Nedelcu, A.M., Lee, R.W., 1998. Complete sequence of the mitochondrial DNA of *Chlamydomonas eugametos*. *Plant Mol. Biol.* 36, 285–295.

- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Fabry, S., Köhler, A., Coleman, A.W., 1999. Intraspecific analysis: comparison of ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectinale*. *J. Mol. Evol.* 48, 94–101.
- Fan, J., Lee, R.W., 2002. Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella parva*: two linear DNA molecules with homologous inverted repeat termini. *Mol. Biol. Evol.* 19, 999–1007.
- Figuerola-Martínez, F., Funes, S., Francén, L.-G., González-Halphen, D., 2008. Reconstructing the mitochondrial protein import machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179, 149–155.
- Fritsch, F.E., 1935. The Structure and Reproduction of the Algae, vol. I. Cambridge University Press, London.
- Fritsch, F.E., 1945. The Structure and Reproduction of the Algae, vol. II. Cambridge University Press, London.
- Funes, S., Davidson, E., Reyes-Prieto, A., Magallón, S., Herion, P., King, M.P., González-Halphen, D., 2002a. A green algal apicoplast ancestor. *Science* 298, 2125.
- Funes, S., Davidson, E., Clares, M.G., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., King, M.P., González-Halphen, D., 2002b. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 277, 6051–6058.
- Funes, S., Reyes-Prieto, A., Pérez-Martínez, X., González-Halphen, D., 2004. On the evolutionary origins of apicoplasts: revisiting the rhodophyte vs. chlorophyte controversy. *Microbes Infect.* 6, 305–311.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fang, E., 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498–511.
- Gawryluk, R.M., Gray, M.W., 2009. A split and rearranged nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial succinate dehydrogenase in *Euglenozoa*. *BMC Res. Notes* 2, 16.
- Gawryluk, R.M., Gray, M.W., 2010. An ancient fusion of mitochondrial Cox1. *Mol. Biol. Evol.* 27, 7–10.
- González-Halphen, D., Funes, S., Pérez-Martínez, X., Reyes-Prieto, A., Clares, M.G., Davidson, E., King, M.P., 2004. Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 232–239.
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476–1481.
- Hackett, J.D., Schertz, T.E., Yoon, H.S., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Bhattacharya, D., 2005. Insights into a dinoflagellate genome through expressed sequence tag analysis. *BMC Genomics* 6, 80–93.
- Hall, T.A., 1998. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Herrmann, J.M., Koll, H., Cook, R.A., Neupert, W., Stuart, R.A., 1995. Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* 270, 27079–27086.
- Herron, M.D., Hackett, J.D., Ayward, F.O., Michod, R.E., 2009. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3254–3258.
- Inagaki, Y., Simpson, A.G.B., Dacks, J.B., Roger, A.J., 2004. Phylogenetic artifacts can be caused by leucine, serine, and arginine codon usage heterogeneity: dinoflagellate plastid origins as a case study. *Syst. Biol.* 53, 582–593.
- Jiménez-Suárez, A., Vázquez-Acevedo, M., Rojas-Hernández, A., Funes, S., Urbbe-Carvajal, S., González-Halphen, D., 2012. In *Polytomella* sp. mitochondria, biogenesis of the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways. *Biochim. Biophys. Acta*, in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmbio.2012.02.038>.
- Keller, A., Schleicher, T., Förster, F., Ruderisch, B., Dandekar, T., Müller, T., Wolf, M., 2008. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales). *BMC Evol. Biol.* 25, 8–218.
- Lapalme, M., Escobar-Ramírez, A., Degand, H., Bausain, D., Rodríguez-Salinas, E., Coosemans, N., Bourry, M., González-Halphen, D., Remacle, C., Cardil, P., 2010. Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial F₁F₀ ATP synthase and role of Aca7 protein in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1630–1644.
- Lewis, L.A., McCourt, R.M., 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91, 1535–1556.
- Li, Z.K., Brand, J., 2007. *Leptolyngxa nodulosa* sp. Nov. (Ocellulariaceae) a subtropical marine cyanobacterium that produces a unique multi-cellular structure. *Phycologia* 46, 396–401.
- Liss, M., Kirk, D.L., Beyer, K., Fabry, S., 1997. Intron sequences provide a tool for high-resolution phylogenetic analysis of volvocine algae. *Curr. Genet.* 31, 214–227.
- Mattox, K.R., Stewart, K.D., 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. In: Irvine, D.E.G., John, D. (Eds.), *The Systematics of the Green Algae*. Academic Press, N.Y., U.S.A.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., et al., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.
- Moestrup, Ø., 1978. Phylogenetic validity of flagellar apparatus in green algae and other chlorophyll a and b containing plants. *Biosystems* 10, 117–144.
- Müller, T., Rahmann, S., Dandekar, T., Wolf, M., 2004. Accurate and robust phylogeny estimation based on profile distances: a study of the Chlorophyceae (Chlorophyta). *BMC Evol. Biol.* 4, 20.
- Nakada, T., Misawa, K., Nozaki, H., 2008. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 281–291.
- Nakayama, T., Marin, B., Kinoshita, H.D., Saito, B., Huss, V.A.R., Inouye, I., Melkonian, M., 1998. The basal position of scaly green flagellates among the green algae (Chlorophyta) is revealed by analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Protist* 149, 367–380.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H., Inouye, I., 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.* 44, 47–55.
- Nedelcu, A.M., Lee, R.W., Lemieux, C., Gray, M.W., Burger, G., 2000. The complete mitochondrial DNA sequence of *Scenedesmus obliquus* reflects an intermediate stage in the evolution of the green algal mitochondrial genome. *Genome Res.* 10, 819–831.
- Nedelcu, A.M., Lee, R.W., 1998. Short repetitive sequences in green algal mitochondrial genomes: potential roles in mitochondrial genome evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15, 690–701.
- Nedelcu, A.M., 1997. Fragmented and scrambled mitochondrial ribosomal RNA coding regions among green algae: a model for their origin and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 14, 506–517.
- Nozaki, H., Misumi, O., Kuroiwa, T., 2003. Phylogeny of the quadriflagellate Volvocales (Chlorophyceae) based on chloroplast multigene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 58–66.
- Nozaki, H., Takahara, M., Nakazawa, A., Kita, Y., Yamada, T., Takano, H., Kawano, S., Kato, M., 2002. Evolution of tbc1 group IA introns and intron open reading frames within the colonial Volvocales (Chlorophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 23, 326–338.
- Nugent, J.M., Palmer, J.D., 1991. RNA-mediated transfer of the gene *cod1* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66, 473–481.
- O'Kelly, C.J., Floyd, G.J., 1983. Flagellar apparatus absolute orientations and the phylogeny of the green algae. *Biosystems* 16, 227–251.
- Oudoux-Le Secq, M.P., Fontaine, J.M., Rousvoal, S., Kloareg, B., Loiseaux-De Goër, S., 2001. The complete sequence of a brown algal mitochondrial genome, the ectocarpale *Pylorella littoralis* (L.) Kjellm. *J. Mol. Evol.* 53, 80–88.
- Oudoux-Le Secq, M.P., Loiseaux-de Goër, S., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2006. Complete mitochondrial genomes of the three brown algae (Heterokontae: Phaeophyceae) *Dicystota dichotoma*, *Fucus vesiculosus* and *Desmarestia vidua*. *Curr. Genet.* 40, 47–58.
- Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkanova, E., d'Alayer, J., Clares, M.G., Davidson, E., King, M.P., González-Halphen, D., 2001. Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J. Biol. Chem.* 276, 11300–11309.
- Pérez-Martínez, X., Funes, S., Tolkanova, E., Davidson, E., King, M.P., González-Halphen, D., 2002. Structure of nuclear-localized *cox3* genes in *Chlamydomonas reinhardtii* and in its colorless close relative *Polytomella* sp. *Curr. Genet.* 40, 399–404.
- Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., Tolkanova, E., Funes, S., Clares, M.G., Davidson, E., King, M.P., González-Halphen, D., 2000. Unusual location of a mitochondrial gene: subunit III of cytochrome c oxidase is encoded in the nucleus of *Chlamydomonad* algae. *J. Biol. Chem.* 275, 30144–30152.
- Posada, D., Buckley, T.R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53, 793–808.
- Pombert, J.F., Beauchamp, P., Otis, C., Lemieux, C., Turmel, M., 2006. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Oltmannsia lloydii* vidua: evolutionary trends of the mitochondrial genome in the Ulvophyceae. *Curr. Genet.* 50, 137–147.
- Pombert, J.F., Otis, C., Lemieux, C., Turmel, M., 2004. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Pseudocostionium alatum* (Ulvophyceae) highlights distinctive evolutionary trends in the chlorophyta and suggests a sister-group relationship between the Ulvophyceae and Chlorophyceae. *Mol. Biol. Evol.* 21, 922–935.
- Prochnik, S.E., Umen, J., Nedelcu, A.M., et al., 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carterii*. *Science* 329, 223–226.
- Pröschold, T., Leliaert, F., 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: Brodie, J., Lewis, J. (Eds.), *Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics*. CRC Press, London, UK, pp. 123–135.
- Pröschold, T., Marin, B., Schüssler, U.G., Melkonian, M., 2001. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist* 152, 265–300.
- Reyes-Prieto, A., Yoon, H.S., Bhattacharya, D., 2006. Phylogenomics and its growing impact on algal phylogeny and evolution. *Algae* 21, 1–10.
- Robbens, S., Derelle, E., Ferraz, C., Wuyts, J., Moreau, H., Van de Peer, Y., 2007. The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tuai*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Mol. Biol. Evol.* 24, 956–968.
- Shoup, S., Lewis, L.A., 2003. Polyphyletic origin of parallel basal bodies in swimming cells of chlorophycean green algae (Chlorophyta). *J. Phycol.* 39, 789–796.
- Smith, D.R., Hua, J., Lee, R.W., 2010. Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Phytococcus*. *Curr. Genet.* 56, 427–438.
- Smith, D.R., Lee, R.W., 2008. Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella capitata*: a linear molecule with an unprecedented GC content. *Mol. Biol. Evol.* 25, 487–496.
- Smith, D.R., Lee, R.W., Cushman, J.C., Magnuson, J.K., Tran, D., Poole, J.E., 2010. The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. *Journal BMC Plant Biol.* 10, 83.

- Smith, D.R., Burki, F., Yamada, T., Gilmore, J., Górgolev, I.V., Van Erven, J.L., Keeling, P.J., 2011. The GC-rich mitochondrial and plastid genomes of the green alga *Cocconeis* give insight into the evolution of organelle DNA nucleotide landscape. *PLoS One* 6, e23624.
- Smith, G.M., 1950. *The Fresh-water Algae of the United States*, second ed. McGraw-Hill, New York.
- Stewart, K.D., Mattox, K.R., 1975. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls A and B. *Bot. Rev.* 41, 104–135.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., Martin, W., 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5, 123–135.
- Tsukihata, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136–1144.
- Turmel, M., Lemieux, C., Buger, G., Lang, B.F., Oris, C., Flanck, I., Gray, M.W., 1999. The complete mitochondrial DNA sequences of *Nephroselmis olivacea* and *Pedinomonas minor*. Two radically different evolutionary patterns within green algae. *Plant Cell* 11, 1717–1730.
- Turmel, M., Brouard, J.S., Gagnon, C., Oris, C., Lemieux, C., 2008. Deep division in the Chlorophyceae (Chlorophyta) revealed by chloroplast phylogenomic analyses. *J. Phycol.* 44, 739–750.
- Vahrenholt, C., Riemann, G., Piatje, E., Dujon, B., Michaelis, G., 1993. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr. Genet.* 24, 241–247.
- Vinogradova, E., Salinas, T., Cognat, V., Remacle, C., Mauchal-Drouard, L., 2009. Steady-state levels of imported tRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages. *Nucleic Acids Res.* 37, 1521–1528.
- Waller, R.F., Keeling, P.J., 2006. Alveolate and chlorophyte mitochondrial *cox2* genes split twice independently. *Gene* 383, 33–37.
- Watanabe, K.I., Ohama, T., 2001. Regular spliceosomal introns are invasive in *Chlamydomonas reinhardtii*: 15 introns in the recently relocated mitochondrial *cox2* and *cox3* genes. *J. Mol. Biol.* 53, 333–339.
- Winkler, M., Kuck, U., 1991. The group IIB intron from the green alga *Senedesmus obliquus* mitochondrion: molecular characterization of the in vitro splicing products. *Curr. Genet.* 20, 495–502.
- Wolff, G., Flanck, I., Lang, B.F., Klück, U., Burger, G., 1994. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prootheca wickerhamii*. Gene content and genome organization. *J. Mol. Biol.* 237, 75–86.
- Worden, A.Z., Lee, J.H., Mock, T., et al., 2009. Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoskayotes *Micromonas*. *Science* 324, 268–272.

Advances in
**BOTANICAL
RESEARCH**

MITOCHONDRIAL GENOME
EVOLUTION



Volume 63

Edited by
LAURENCE MARÉCHAL-DROUARD

Series Editors
JEAN-PIERRE JACQUOT &
PIERRE GADAL





MITOCHONDRIAL GENOME EVOLUTION

Volume Editor

Laurence Maréchal-Drouard
*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes,
UPR 2357 du CNRS, Université de Strasbourg,
Strasbourg, France*



Amsterdam • Boston • Heidelberg • London
New York • Oxford Paris • San Diego
San Francisco • Singapore • Sydney • Tokyo
Academic Press is an imprint of Elsevier



Academic Press is an imprint of Elsevier
The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
32, Jamestown Road, London NW1 7BY, UK
Radarweg 29, PO Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands
225 Wyman Street, Waltham, MA 02451, USA
525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, USA

First edition 2012

Copyright © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise without the prior written permission of the publisher.

Permissions may be sought directly from Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford, UK: phone (+44) (0) 1865 843830; fax (+44) (0) 1865 853333; email: permissions@elsevier.com. Alternatively you can submit your request online by visiting the Elsevier web site at <http://elsevier.com/locate/permissions>, and selecting *Obtaining permission to use Elsevier material*

Notice

No responsibility is assumed by the publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of rapid advances in the medical sciences, in particular, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made

ISBN: 978-0-12-394279-1

ISSN: 0065-2296

For information on all Academic Press publications
visit our Web site at store.elsevier.com

Printed and bound in USA
12 13 14 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Working together to grow
libraries in developing countries

www.elsevier.com | www.sciencedirect.com | www.scribd.com

ELSEVIER 1800-4011
Technical Support **Sobry Hameed**

CONTENTS

<i>Contributors</i>	vii
<i>Preface</i>	x
<i>Contents of Volumes 35–62</i>	xvi
1. Mitochondrial and Eukaryotic Origins: A Critical Review	1
B. Franz Lang and Gertraud Burger	
2. Gene Content and Gene Transfer from Mitochondria to the Nucleus During Evolution	21
Minoru Ueda and Kohichi Kadouki	
3. The Role of Horizontal Transfer in Shaping the Plant Mitochondrial Genome	41
Jeffrey P. Mower, Kanika Jain and Nancy J. Hepburn	
4. Mitochondrial Genome Evolution and Gynodioecy	71
Pascal Touzet	
5. Cytonuclear Adaptation in Plants	99
Françoise Budar and Sota Fujii	
6. Mitochondrial Genomes of Photosynthetic Euglenids and Alveolates	127
Pavel Flegontov and Julius Lukeš	
7. Evolution of Mitochondrial Introns in Plants and Photosynthetic Microbes	155
Linda Bonen	
8. Green Algae Genomics: A Mitochondrial Perspective	187
Elizabeth Rodríguez-Salinas, Claire Remacle and Diego González-Halphen	
9. Recombination in the Stability, Repair and Evolution of the Mitochondrial Genome	215
Kristina Kühn and José M. Guaberto	
	v

10. Mitochondrial Genome Evolution and the Emergence of PPR Proteins	253
Bernard Gutmann, Anthony Gobert and Philippe Giegé	
11. Evolution of Protein Import Pathways	315
Beata Kmiec, Elzbieta Glaser, Owen Duncan, James Whelan and Monika W. Mucha	
12. Macromolecules Trafficking to Plant Mitochondria	347
Morgane Michaud and Anne-Marie Duchêne	
<i>Index</i>	423



Green Algae Genomics: A Mitochondrial Perspective

Elizabeth Rodríguez-Salinas*, Claire Remacle[†]
and Diego González-Halphen^{‡,1}

^{*}Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

[†]Genetics of Microorganisms, Institute of Plant Biology, University of Liège, Liège, Belgium

[‡]Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

¹Corresponding author. E-mail: dhalphen@ifc.unam.mx

Contents

1. Introduction	188
1.1. Habitats	188
1.2. Taxonomy	189
2. Chlorophyte Genomes Overview	189
2.1. Nuclear	189
2.2. Chloroplast	194
2.3. Mitochondrial	195
2.4. Mitochondrial Genetics and Mitochondrial Mutants	198
3. Mitochondrial Genome Evolution	199
3.1. Structure	199
3.2. Organization	200
3.3. Gene Dynamics	202
3.3.1. Gene transfer to the nucleus	202
3.3.2. Transfer of other DNA elements	204
3.3.3. Recent gene acquisitions	204
4. Comparative Genomics and Acquisition of New Metabolic Capabilities	204
4.1. Ancestral Organelle Genomes as Evidence of Green Plant Evolution	205
4.2. Evolutionary Mechanisms	206
5. Perspectives	207
Acknowledgements	207
References	208

Abstract

Organelle genomics has provided a new perspective for studying the evolution of green algae, mainly by allowing high throughput inter- and intra-species analyses. Therefore, the number of fully sequenced nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes for green algae is continuously expanding. Comparative studies of mitochondrial genomes have revealed an enormous diversity in genome organization, structure, and gene content. Analyses have provided clues to gene transfer

events from the mitochondrion to the nucleus, as well as to gene acquisitions that have taken place during the evolutionary history of green algae. This review focuses on the diversity observed among the mitochondrial genomes of green algae that have been sequenced. This information, along with several chloroplast genomes and an ever-growing number of fully sequenced nuclear genomes, will help us eventually understand the still obscure phylogenetic relationships among green algae, the cross-talk between their organelles (nucleus, chloroplast and mitochondria), and the genetic basis of the extraordinary metabolic plasticity of chlorophytes.



1. INTRODUCTION

According to the endosymbiotic theory, aerobic organisms originated when an unknown organism, most probably a protoeukaryote or an archaea, internalized an α -proteobacteria (Martin & Müller, 1998; Poole & Penny, 2006; Sagan, 1967). Some descendants of this lineage underwent a second endosymbiotic event and internalized a cyanobacteria. The resulting organisms were able to respire and to perform oxygenic photosynthesis (Sagan, 1967). Taxonomically, photosynthetic eukaryotes are currently placed under the group Archaeplastida, which is divided into the lineages Glaucophyta, Rhodophyta (i.e. red algae) and Chloroplastida (i.e. green algae and land plants) (Rodríguez-Espeleta *et al.*, 2005). Green algae and land plants comprise the Viridiplantae kingdom. Green algae, whose main morphological and biochemical characteristics are double-membrane chloroplasts that contain the photosynthetic pigments chlorophylls *a* and *b* and the accessory pigments carotenoids and xanthophylls (Melkonian, 1990), have been assigned the phylum Chlorophyta.

1.1. Habitats

Green algae are found worldwide in a broad range of habitats. Most of them are free-living aquatic organisms that inhabit fresh, brackish or salt waters (Margullis *et al.*, 1990). However, others are epiphytic (Lüttge & Büdel, 2010), epizoic (Garbary, Bourquea, Herman, & McNeil, 2007), parasitic (de Koning & Keeling, 2006) or endosymbiotic of fungi, protozoans (Nishihara *et al.*, 1998) or animals (Kerney *et al.*, 2011; Lewis & Mueller-Parker, 2004). Some are able to withstand extreme environments such as snow (Mosser, Mosser, & Brock, 1977), desert (Cardon, Gray, & Lewis, 2008), or halites (Lowenstein, Schubert, & Timofeeff, 2011), because they can endure long periods of desiccation. A number of green soil algae have been shown to

survive 35 years of desiccation under laboratory conditions (Trainor & Gladych, 1995), or even of millions of years suspended in halites (Lowenstein *et al.*, 2011). The ability to inhabit this wide array of niches suggests that green algae have an underlying metabolic plasticity that must be reflected at the genomic level.

1.2. Taxonomy

Green algae taxonomy has been widely disputed since they were described by Linneo in 1753 (Moestrup, 2006). The conundrum lies within the great diversity of their morphological, ultrastructural and molecular characteristics (Lewis & McCourt, 2004; Pröschold, 2001). Nonetheless, it is widely accepted that the phylum Chlorophyta encompasses four main groups or classes designated as Prasinophyceae (Tunnel, Lemieux, *et al.*, 1999), Trebouxiophyceae, Ulvophyceae and Chlorophyceae (Lewis & McCourt, 2004; Nakayama *et al.*, 1998; van den Hoek, Mann, & Jahns, 1995). Phylogenetic studies have shown the group Prasinophyceae to be paraphyletic, while the group Trebouxiophyceae is sister to the groups Ulvophyceae and Chlorophyceae (Pombert, Otis, Lemieux, & Turmel, M, 2004; Pröschold & Leliaert, 2007). A fifth group, designated Pedinophyceae, has been proposed, however its class status remains controversial (Lewis & McCourt, 2004). Analysis of the structural genomic features and phylogenetic analysis of chloroplast sequence data has helped untangle the evolutionary relationships between Chlorophyceae (Brouard, Otis, Lemieux, & Turmel, 2010).



2. CHLOROPHYTE GENOMES OVERVIEW

Although genomics is an emerging discipline within green algae phycology, it has been shown to be a powerful tool for single-gene and whole-genome analyses from an evolutionary perspective. Green algae or chlorophytes contain three genomes: nuclear, chloroplast and mitochondrial (Table 8.1). Nuclear and chloroplast genomes are addressed briefly; the focus of this work is mitochondrial genomes.

2.1. Nuclear

The first chlorophyte genome to be fully sequenced and annotated was *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) (Merchant *et al.*, 2007). *C. reinhardtii* is considered a model eukaryotic organism because of its short

<i>Chlorella</i> sp.	T	DOE Joint Genome Institute	–	–	–	–	–
<i>Chlorella variabilis</i>	T	–	–	–	–	NC_015359	124
<i>Chlorella vulgaris</i>	T	–	–	–	–	NC_001865	150
<i>Helicosporidium</i> sp.	T	TBestDB	–	–	–	NC_008100 ^b	37
<i>Leptosira terrestris</i>	T	–	–	–	–	NC_009681	195
<i>Oocystis solitaria</i>	T	–	–	–	–	–	–
<i>Parachlorella kessleri</i>	T	–	–	–	–	NC_012978	123
<i>Prototheca wickerhamii</i>	T	TBestDB	NC_001613	Circular	55	–	–
<i>Chlamydomonas eugametos</i>	C	–	NC_001872	Circular	22	–	–
<i>Chlamydomonas inertia</i>	C	TBestDB	–	–	–	–	–
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	C	Aberystwyth University ^a	–	–	–	–	–
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	C	DOE Joint Genome Institute	NC_001638	Linear: 1 chromosome	15	NC_005353	203
<i>Dunaliella salina</i>	C	DOE Joint Genome Institute	NC_012930	Circular	28	–	–
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	C	Yale University	–	–	–	–	–
<i>Floidiella terrestris</i>	C	–	–	–	–	NC_014346	521
<i>Oedogonium cardiacum</i>	C	–	–	–	–	NC_011031	196
<i>Polytomella capuana</i>	C	–	NC_010357	Linear: 1 chromosome	12	–	–
<i>Polytomella pava</i>	C	TBestDB	–	Linear: 2 chromosomes	13.5 y 3.5	–	–
<i>Polytomella</i> sp.	C	–	NC_013472 ^b	–	13 y 3	–	–

(Continued)

Table 8.1 Sequenced genomes of green algae—cont'd

Taxa	Class	Consortium	Nuclear genome			Mitochondrial genome		Chloroplast genome	
			Accession number	Structure	Size (kb)	Accession number	Size (kb)		
<i>Sarwednesmus obliquus</i>	C	TBestDB	NC_002254	Linear: 2 chromosomes	42	NC_008101	161		
<i>Sageodinium helveticum</i>	C	–	–	Circular	–	NC_008372	223		
<i>Volvox carterii</i>	C	DOE Joint Genome Institute	Smith and Lee, 2009	Linear: >1 chromosome	30	–	420		
<i>Pedinomonas minor</i>	Pe	–	NC_000892	Circular	25	–	–		

The complete nuclear genome of taxa in the TBestDB have not been sequenced; only expressed sequence tags are available. All chloroplast genomes have a circular structure. P, Phaeophyceae; U, Ulvophyceae; T, Trebouxiophyceae; C, Chlorophyceae; Pe, Pfiesterophyceae. DOE Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/>), TBestDB (<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/research/welcome.php>), Yale University (<http://www.eng.yale.edu/peccialab/microalgae/sequences.html>). GenBank accession numbers are provided (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^aSequence not available.
^bIncomplete sequence.

generation time, sexual and asexual reproduction, unicellular and haploid nature, easy genetic manipulation (i.e. its three genomes are subject to specific transformation), and metabolic plasticity (i.e. heterotroph and facultative autotroph; aerobic and facultative anaerobe) (Funes, Franzén, & González-Halphen, 2007; Grossman *et al.*, 2003). Genome analysis revealed that the nuclear genome of *C. reinhardtii* consists of 127 Mb distributed in 17 chromosomes. Proteomic analysis revealed that 50% of the encoded proteins are homologous to their counterparts in other eukaryotes, such as humans and *Arabidopsis thaliana*. Of these proteins 10% are related to flagellar and basal body ultrastructures (cilia and centrioles), and 26% are associated with photosynthesis (thylakoid biogenesis and pigment biosynthesis) (Atteia *et al.*, 2009; Merchant *et al.*, 2007; Rolland *et al.*, 2009). Recently, the genome of *Volvox carteri* (Chlorophyceae) has been completed (Prochnik *et al.*, 2010); however, it is still being assembled. *V. carteri* belongs to a family of multicellular algae (Volvocales) and thus constitutes a model for studying the transition from unicellularity to multicellularity (Herron, Hackett, Aylward, & Michod, 2009). The nuclear genome of *V. carteri* consists of 138 Mb distributed in 14 chromosomes. A preliminary analysis suggests the presence of a large number of proteins involved in cell cycle regulation: the cyclins. *V. carteri* contains five types of D cyclins; *C. reinhardtii* only has three orthologues. The larger number of cyclins probably constituted a key factor in the appearance of processes related to cellular proliferation (Prochnik *et al.*, 2010).

Phytoplankton is responsible for fixing 50–60% of the CO₂ in the planet. It includes cyanobacteria and eukaryotic microalgae, mainly several members of the class Prasinophyceae. Three species from the genus *Ostreococcus* have been described based mainly on the depth of the ocean that they inhabit and thus, on the amount of light they receive: *O. lucimarinus*, *O. tauri* (Palenik, 2007) and *Ostreococcus* sp (Robbens *et al.*, 2007). Analysis of these sequenced genomes has provided important insights into adaptation and speciation processes. First, it was noted that *O. tauri* and *O. lucimarinus* have a different genome size and chromosome number: 12.6 Mb and 20 chromosomes, and 13.2 Mb and 21 chromosomes, respectively (the genome of *Ostreococcus* sp. has not yet been annotated). Despite the different chromosome numbers, 18 of them share similar gene content and order. Second, regarding gene content, the following observations were made. Both species have (1) lost genes that encode transcription factors and proteins related to the cell wall and flagella biosynthesis; (2) contain fused genes that are involved in pigment biosynthesis and nitrate metabolism; (3) contain

a unique methylation/demethylation system (i.e. bacterial methyltransferases fused to a chromatin domain) potentially involved in exogenous DNA detection. Third, *O. lucimarinus* encodes a large number of selenium proteins that have been suggested to take part in essential metal metabolism (Palenik, 2007). Other prasinophycean algae whose nuclear genomes have been sequenced are *Micromonas* sp. and *Micromonas pusilla*. These species are 90% identical; the main difference relies on the presence or absence of different riboswitches, repetitive elements and transporters (Worden *et al.*, 2009).

Chlorella members can be either free living or endosymbionts. Thus, the genomes of *Coccomyxa* sp. and *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) will provide important insights into the differences between free-living and endosymbiotic green algae, respectively (DOE Joint Genome Institute, <http://www.jgi.doe.gov/>). Furthermore, the genus *Chlorella* hosts a family of double-stranded DNA freshwater viruses that infect approximately 20% of *Chlorella* populations. These viruses play a significant role in global carbon and nitrogen cycles (Van Etten & Dunigan, 2012).

2.2. Chloroplast

At present, 22 chloroplast genomes of green algae have been sequenced (Table 8.1). These genomes have been classified according to the organization of the gene and the direction in which they are transcribed. They are divided into four regions: two inverted palindromic sequences that encode rRNAs; and two regions, one short and one large, that contain single copy genes designated as SSC (small single copy) and LSC (large single copy).

The average configuration is a quadripartite structure in which the inverted palindromic repeats are separated by the SSC and LSC regions; and the genes encoding the rRNAs are transcribed in the SSC direction. This gene-partitioning pattern is similar to that of chloroplast genomes of land plants (Turmel, Otis, & Lemieux, 1999). Members of the Prasinophyceae, Pedinophyceae and Trebouxiophyceae classes have this configuration (Belanger *et al.*, 2006; Turmel, Otis, *et al.*, 2009). The exception is the chloroplast genome of *C. vulgaris* (Trebouxiophyceae), which presents a tripartite structure that lacks the inverted palindromic repeats (Belanger *et al.*, 2006). In members of the Ulvophyceae class, the quadripartite structure is conserved; however, the encoded rRNA genes are transcribed in the opposite direction (Pombert, Otis, Lemieux, & Turmel, 2005; Pombert, Lemieux, & Turmel, 2006). Chloroplast genomes within the class

Chlorophyceae reveal great structural diversity. For example, the chloroplast genome of *Ságeodonium helveticum* lacks the inverted palindromic repeats (Belanger *et al.*, 2006); and *S. obliquus*, *C. reinhardtii* and *Oedogonium cardiacum* contain unique gene regions of single copy genes of similar length but with variable gene content (Brouard, Otis, Lemieux, & Turmel, 2008; de Cambiaire, Otis, Lemieux, & Turmel, 2006; Maul *et al.*, 2002).

2.3. Mitochondrial

Mitochondrial genomes are usually compact and contain a limited set of genes encoding proteins related to oxidative phosphorylation (OXPHOS) (i.e. complexes I–V), tRNAs and rRNAs (Gray, Burger, & Lang, 1999). A total of 16 mitochondrial green algal genomes have been fully sequenced and annotated (Table 8.2). According to their gene content they have been

Table 8.2 Gene content of completely sequenced chlorophycean mitochondrial genomes

Gene	P			U		T	Pe	C						
	No	Ot	Msp	Pp	Ov	Pa	Csp	Pw	Pm	So	Ds	Ce	Cr	Pc
OXPHOS	<i>nad1</i>	+	+	^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>nad2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>nad3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>nad4</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>nad4L</i>	+	^a	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>nad5</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>nad6</i>	+	+	^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>nad7</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	<i>nad9</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	<i>nad10</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>cob</i>	+	^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cox1</i>	+	^a	^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cox2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	^b	-	-	-
	<i>cox3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	<i>atp1</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>atp4</i>	+	+	^a	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
<i>atp6</i>	+	+	^a	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
<i>atp8</i>	+	^a	^a	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>atp9</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
Ribosome	<i>rpl5</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	<i>rpl6</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

(Continued)

Table 8.2 Gene content of completely sequenced chlorophycean mitochondrial genomes—cont'd

Gene	P				U		T		Pe		C			
	No	Ot	Msp	Pp	Ov	Pa	Csp	Pw	Pm	So	Ds	Ce	Cr	Pc
<i>ps14</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ps16</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps2</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps4</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps7</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps8</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ps10</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps11</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps12</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps13</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps14</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ps19</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
rRNAs														
<i>ml</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	^a	+	-	^b	-	-
<i>ms</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	^b	-	-
<i>nl</i>	-	+	^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>nn</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	^b	+
<i>ns</i>			^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total tRNAs	26	26	34	16	24	25	26	26	8	27	3	3	3	1

^aDuplicated genes.^bSpliced genes.

Gene content of each gene was derived from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33090&opt=organelle>). Unique proteins to each genome that are neither OXPHOS nor ribosomal related were excluded. P, *Phaeophyceae*; U, *Uleophyceae*; T, *Trebouxiophyceae*; Pe, *Prasinophyceae*; C, *Chlorophyceae*. No, *Nephroselmis olivacea*; Ot, *Ostreococcus tauri*; Pw, *Proothoa walsbyana*; Msp, *Micromonas* sp.; Pp, *Pyrococcus proteus* Li; Ov, *Oltmannsiella pus viridis*; Pa, *Paracaulodomon akutanore*; Csp, *Cocconeis* sp.; Pm, *Pedinomonas minor*; So, *Sorvalasmus obliquus*; Ds, *Dunaliella salina*; Ce, *Chlamydomonas angustata*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Pc, *Polytomella capsata*.

classified into ancestral, reduced and intermediate (Nedelcu, Lee, Lemieux, Gray, & Burger, 2000; Turmel, Lemieux *et al.*, 1999) (Fig. 5.1).

Ancestral genomes are between 44 and 95 kb in size and contain genes that encode OXPHOS proteins, the complete set of tRNAs, and rRNAs (Nedelcu *et al.*, 2000). The latter are located continuously in the mitochondrial genome and seem to be evolving much faster than their nuclear counterparts (Popescu & Lee, 2007). The genomes of the prasinophycean (Turmel, Lemieux *et al.*, 1999), ulvophycean (Pombert *et al.*, 2004) and trebouxiophycean (Pombert & Keeling, 2010; Wolff, Plante, Lang, Kück, & Burger, 1994) algae belong to this group.

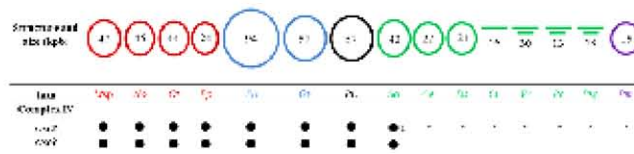


Figure 8.1 *cox2* and *cox3* gene diversity in chlorophyte genomes. The genome structure of chlorophytes. The numbers indicate the size in kilobase pairs. Msp, *Micromonas* sp; No, *Nephroselmis olivacea*; Ot, *Ostreococcus tauri*; Pp, *Pycnococcus provasolii*; Pa, *Pseudodactylonium akinetum*; Ov, *Oltmannsiellopsis viidisi*; Pw, *Prototheca wickerhamii*; Sq, *Scenedesmus obliquus*; Ce, *Chlamydomonas eugametas*; Ds, *Dunaliella salina*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Vc, *Volvox carterii*; Pc, *Polytomella capuana*; Psp, *Polytomella* sp; Pm, *Pedinomonas minor*. The circle indicates the presence and the line indicates the absence of the corresponding gene within the mitochondrial genome. *cox2a* gene. For colour version of this figure, the reader is referred to the online version of this book.

Reduced genomes are between 12 and 28 kb in size and contain genes that encode some OXPHOS proteins, an incomplete set of tRNAs, and some rRNAs. The missing tRNAs must therefore be imported from the cytosol into mitochondria, probably through a mechanism similar to that used by plants (Rubio & Hopper, 2011; Salinas, Duchêne, & Maréchal-Drouard, 2008; Sieber, Plácido, El Farouk-Ameqrane, Duchêne, & Maréchal-Drouard, 2011). The ribosomal RNAs may be fragmented and are located intermittently in the mitochondrial genome. The genomes of the chlorophycean and pedinophycean algae belong to this group (Tumel, Lemieux *et al.*, 1999).

The mitochondrial genomes of *P. provasolii* (Prasinophyceae) and *S. obliquus* (Chlorophyceae) share characteristics of both types of genomes. *P. provasolii* has 24 kb, like the reduced type. However, its gene content and organization (except for the rRNA genes) resemble that of the ancestral type genomes (Tumel, Otis, & Lemieux, 2010). The genome of *S. obliquus* is larger, with 43 kb, in the range of the ancestral genomes. Nonetheless, its gene content and arrangement is similar to that of reduced genomes (Nedelcu *et al.*, 2000).

Many green algae use the chlorophycean mitochondrial genetic code (The Genetic Codes-NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>), although others have deviant mitochondrial genetic codes (Hayashi-Ishimaru, Ohama, Kawatsu, Nakamura, & Osawa, 1996). Three chlorophytes use an alternate genetic code for certain amino acids: in *Pedinomonas minor* (Pedinophyceae) the stop codon TGA codes tryptophan (Tumel, Lemieux *et al.*, 1999); in *S. obliquus* (Chlorophyceae) the stop

codon TAG codes leucine and the triplet TCA codes a stop codon (Nedelcu *et al.*, 2000); and in *P. provasolii* (Prasinophyceae) the stop codon TGA codes tryptophan, and the standard leucine codons TTA and TTG code stop codons (Tumel *et al.*, 2010).

2.4. Mitochondrial Genetics and Mitochondrial Mutants

Transmission of the mitochondrial genome has been studied in *C. reinhardtii*. The pioneer work of Boynton, Harris, Burkhardt, Lamerson, and Gillham (1987) demonstrated that sexual zygotes transmit chloroplast and mitochondrial DNA from their opposite mating type, mitochondrial DNA being inherited from the mt^- parent and chloroplast DNA from the mt^+ parent. The fate of mitochondrial DNA was analysed in zygotes and during maturation of the zygospore (Beckers, Munaut, Minet, & Matagne, 1991). The mitochondrial DNA of mt^+ origin is slowly degraded during zygote maturation and light is required for total elimination of mt^+ mitochondrial DNA in the zygospores. Contrary to the situation found for chloroplasts where DNA from mt^+ origin is methylated and transmitted to the progeny (Uman & Goodenough, 2001), no methylation of mitochondrial DNA could be detected. These results were further confirmed by Nakamura's group who correlated the transmission of mt^- mitochondrial DNA to a selective elimination of mt^+ mitochondrial nucleoids after zygote formation (Aoyama, Hagiwara, Misumi, Kuroiwa, & Nakamura, 2006; Nakamura, 2010; Nakamura, Aoyama, & Van Woesik, 2003).

The first mitochondrial mutants in *C. reinhardtii* have been isolated and described by Matagne, Michel-Wolwertz, Munaut, Duyckaerts, and Sluse (1989). These mutants exhibit a terminal deletion of their mitochondrial genome including the *cob* gene. Phenotypically, they are unable to grow in heterotrophic conditions (dark + acetate) contrary to the wild-type strain because they lack the respiratory complex III. These mutants were called *dum* for dark uniparental transmission by the mt^- parent. Other *dum* mutants have since been isolated based on their inability to grow in the dark. They exhibit either long deletions including several genes (such as *cob*, *nad4* and *nad5*) or frameshift mutations in the *nad1*, *nad5* or *nad6* genes (Colin *et al.*, 1995; Dorthu *et al.*, 1992; Duby & Matagne, 1999). Myxothiazol-resistant mutants with substitutions in the *cob* gene have also been characterized (Bennoun, Delosme, & Kück, 1991). *C. reinhardtii* is also the only green organism in which mitochondrial transformation is possible (Randolph-Anderson *et al.*, 1993; Remade, Cardol, Coosemans, Gaisne, & Bonnefoy,

2006; Yamasaki, Kurokawa, Watanabe, Ikuta, & Ohama, 2005). This technique has been used recently to reconstruct a human mitochondrial complex I mutation in the mitochondrial genome of this alga (Larosa, Coosemans, Motte, Bonnefoy, & Remacle, 2012). Since human mitochondrial mutations are often difficult to study, this system could represent an attractive tool to study the fundamental effects of human mitochondrial complex I mutations (Barbieri *et al.*, 2011). This is of special interest because the other organism in which mitochondrial transformation is feasible, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Bonnefoy, Remacle, & Fox, 2007), lacks complex I.



3. MITOCHONDRIAL GENOME EVOLUTION

The number of completely sequenced green algae mitochondrial genomes is expanding rapidly. Comparative studies have revealed a great diversity in mitochondrial genome structure, organization and gene content.

3.1. Structure

Most mitochondrial genomes have different molecular structures (Table 8.1), although in most cases they are circular. However, *C. reinhardtii* (Boer & Gray, 1988; Michaelis, Vahrenholz, & Pratje, 1990; Vahrenholz, Riemen, Pratje, Dujon, & Michaelis, 1993), *V. carteri* (Smith & Lee, 2009) and algae from the genus *Polytomella* (Mallet & Lee, 2006), all chlorophycean, have a linear structure. Furthermore, *V. carteri* (Smith & Lee, 2009) and members of the *Polytomella* genus (Mallet & Lee, 2006) have more than one chromosome. Structural differences within the same genus have also been described. For example, the mitochondrial genome of *Polytomella capuana* consists of a single linear chromosome 12 kb in length. In contrast, the genomes of *Polytomella parva* and *Polytomella* sp. consist of two linear chromosomes each: 13.5 kb and 3.5 kb, and 13 kb and 3 kb, respectively (Mallet & Lee, 2006; Smith, Hua *et al.*, 2010).

Telomeric sequences have been described at the ends of linear chromosomes of chlorophycean mitochondrial genomes. These sequences consist of single-stranded inverted repeats of approximately 580 bp (Fan & Lee, 2002). It has been suggested that telomeric sequences, as well as short intergenic repeats that are present throughout the mitochondrial genomes of green algae, act as substrates for recombination events (Nedelcu & Lee, 1998). For example, Smith and Lee (2008) used

a segment of an inverted repeat located within the intergenic region of the genes *nad6* and *cob* of *P. capuana* (one linear chromosome) to hypothetically recombine it with the homologous repeats located within the telomeric regions. As a result two products, similar to both linear chromosomes of *P. parva*, were inferred. Therefore, inverted interspersed repeats may be the consequence of the corresponding insertion or deletion events (Nedelcu & Lee, 1998). Short repeats have been described in all members of the chlorophycean class; nonetheless, their abundance within each genome varies. Mitochondrial genomes of the ancestral type are rich in A + T regions with a length between 6 and 17 bp; the reduced type are rich in G + C regions with a length between 9 and 14 bp (Nedelcu & Lee, 1998).

3.2. Organization

Gene content is different among mitochondrial genomes of chlorophytes (Table 8.2). Focussing exclusively on OXPHOS protein coding genes, we have identified contiguous arrangements of three or more consecutive genes (Table 8.3). Usually, gene order (i.e. synteny) is preserved among phylogenetically related organisms, and thus may constitute a molecular tool for assessing evolutionary relationships among green algae (Tamames, 2001). However, as shown in Table 8.3, gene order among chlorophycean algae is highly variable, even among members of the same class.

The first two arrangements were present only in prasinophycean algae. *Micromonas* sp. and *O. tauri* present the arrangement (*atp9*)-*nad7*-*nad3*, where the gene *atp9* is located in the complement strand. *Micromonas* sp., *N. olivacea* and *O. tauri* present the arrangement *cox2-cox3*-(*nad2*)-(*nad4*)-(*nad5*) where the *nad* genes are located in the complement strand. In *N. olivacea*, the *nad* genes are oriented in the opposite direction and are located in the coding strand (i.e. *cox2-cox3-nad5-nad4-nad2*). Furthermore, *P. provansolii* presents the *cox3-nad5-nad4-nad2* arrangement. The contiguous *nad5-nad4-nad2* genes are characteristic of eubacterial mitochondrial genomes (Lang et al., 1997). This agrees with the fact that the Prasinophyceae constitute the earliest divergent class within green algae (Tunnel, Lemieux et al., 1999). The arrangement (*nad4L*)-*atp1*-*nad1* is found in *P. akinetum* (Ulvothyceae) and *P. wickerhamii* (Trebouxiophyceae). Nonetheless, in the latter, all the genes are located in the coding strand. *P. capuana* (Chlorophyceae) and *P. minor* (Pedinophyceae) present the arrangement *cox1-nad4-nad2*.

Table 8.3 OXPHOS Gene arrangements in chlorophycean mitochondrial genomes

Class	Taxa	Gene order
P	<i>Micromonas</i> sp.	(<i>cob</i>)-(nad 6)-atp 6-nad 1 ^a -(<i>cox 1</i>)-(atp 4)- (atp 8)-(nad 4L)-(atp 9)-nad 7-nad 3- (nad 9)-atp 8-atp 4-cox 1 ^a -(nad 1)-(atp 6)- nad 6-cox 2-cox 3-(nad 2)-(nad 4)-(nad 5)
	<i>Ostreococcus tauri</i>	<i>cob</i> -(nad 1)-(atp 6)-nad 6-cox 2-cox 3-(nad 2)- (nad 4)-(nad 5)- <i>cob</i> -(<i>cox 1</i>)-(atp 4)- (atp 8)-(nad 4L)-(atp 9)-nad 7-nad 3- (atp 1)-(nad 9)-nad 4L-atp 8-atp 4-cox 1 ^a
	<i>Nephroselmis olivacea</i>	(<i>cob</i>)-(nad 3)-(nad 7)-(atp 1)-(atp 6)-nad 6-cox 2- cox 3-nad 5-nad 4-nad 2-atp 9-(cox 1)- (nad 9)-(nad 10)-nad 4L-atp 8-atp 4-(nad 1)
	<i>Pycnococcus provasolii</i>	<i>cob</i> -nad 3-atp 4-atp 8-atp 6-nad 4L-nad 1-cox 2- cox 1-atp 9-cox 3-nad 5-nad 4-nad 2-nad 6
U	<i>Oltmannsiellopsis virens</i>	(<i>cob</i>)-(atp 4)-nad 5-(nad 3)-(nad 7)-(atp 9)-nad 9- (nad 3)-(nad 7)-(atp 9)-(atp 1)-nad 2-nad 5- nad 4L-atp 6-atp 8-cox 1-cox 2-cox 3-nad 1- nad 6-nad 4
	<i>Pseudendocrium alvionum</i>	(<i>cob</i>)-(nad 4)-(nad 4L)-atp 1-nad 1-nad 5-cox 2- (cox 1)-(nad 6)-nad 3-atp 8-nad 2-(cox 3)- (atp 4)-(atp 6)-(nad 7)
T	<i>Coccomyxa</i> sp.	<i>cob</i> -nad 5-nad 7-nad 2-nad 4L-cox 1-atp 1-nad 1- nad 4-cox 2-cox 3-atp 6
	<i>Prototheca wickerhamii</i>	(<i>cob</i>)-(atp 6)-(nad 3)-nad 6-nad 4L-atp 1-nad 1- nad 2-(cox 1)-(nad 4)-(nad 5)-(nad 7)-(cox 3)- (cox 2)-(atp 8)-(nad 9)
C	<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>cob</i> -atp 9-cox 2-nad 5-nad 4L-nad 3-cox 3-nad 1- (atp 6)-nad 2-cox 1-nad 4-nad 6
	<i>Chlamydomonas eugametos</i>	<i>cob</i> -cox 1-nad 1-nad 5-nad 6-nad 4-nad 2
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	(<i>cob</i>)-(nad 4)-(nad 5)-cox 1-nad 2-nad 6-nad 1
	<i>Dunaliella salina</i>	<i>cob</i> -nad 6-nad 5-nad 1-nad 4-cox 1-nad 2
	<i>Polytomella capuana</i>	(<i>cob</i>)-cox 1-nad 4-nad 2-nad 5-nad 1-(nad 6)
Pe	<i>Pedinomonas minor</i>	<i>cob</i> -atp 8-nad 5-atp 6-nad 4L-cox 1-nad 4-nad 2- nad 1-nad 6-nad 3

The gene *cob* is set as the start point for analysis, however, the exact gene order is indicated in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?accid=330908&opt=organelle>. Comsecutive gene arrangements are highlighted. Parentheses indicate that the gene is located in the complementary DNA strand. P., Pfiasterophyceae; U., Ulvophyceae; T., Trebouxiophyceae; Pe., Pedinophyceae; C., Chlorophyceae. ^aDuplicated genes.

3.3. Gene Dynamics

3.3.1. Gene transfer to the nucleus

Mitochondrial genomes are highly dynamic; they can modify, eliminate or rearrange their genetic material (Gray *et al.*, 1999). After the first endosymbiosis event, a massive gene transfer from the mitochondrial genome to the nuclear genome ensued, which increased the complexity of the nuclear genome and reduced the gene content in mitochondrial genomes (Gray *et al.*, 1999). When relocated to the nuclear genome, mitochondrial genes are usually transferred as a single entity (Adams *et al.*, 1999; Pérez-Martínez *et al.*, 2002). However, nuclear relocation as split genes has been reported (Adams, Ong, & Palmer, 2001; Funes *et al.*, 2002; Gawryluk & Gray, 2009; Gawryluk & Gray, 2010; Pérez-Martínez *et al.*, 2001).

Only two genes are universally located in the mitochondrial genome: *cox1* and *cob*, encoding subunit I of cytochrome *c* oxidase and cytochrome *b*, respectively. In those organisms that contain the whole set of respiratory complexes I–IV, the genes *nad1*, *nad2*, *nad4* and *nad5* are also always present in the mitochondrial genome. The main characteristic of these mitochondria-encoded proteins is that they exhibit a high hydrophobic profile (i.e. they contain from 8 to 16 transmembrane stretches) (Adams & Palmer, 2003). The vast majority of eukaryotic organisms also carry the following genes in their mitochondrial genomes: *cox2*, *cox3*, *nad3*, *nad4L*, *atp6*, and *atp8*. Several of these genes have migrated to the nucleus in some lineages of chlorophycean algae. In *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp. and *S. obliquus* (Chlorophyceae), the mitochondrial gene *cox2* is split into two genes: *cox2a* and *cox2b*. The *cox2a* and *cox2b* genes encode a polypeptide that corresponds to a portion of a heterodimeric COX2 subunit; the amino-terminal half and the carboxy-terminal half, respectively (Pérez-Martínez *et al.*, 2001). In *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. both genes are located in the nuclear genome (Pérez-Martínez *et al.*, 2001) but in *S. obliquus* only the gene *cox2b* is located in the nuclear genome, and the gene *cox2a* remains in the mitochondrial genome (Funes *et al.*, 2002). More recently, the distribution of intact and split *cox2* gene sequences was analysed in several algae pertaining to the phylum Chlorophyta. The algae in classes Prasinophyceae, Ulvophyceae, and Trebouxiophyceae all contain orthodox, intact mitochondrial *cox2* genes. In contrast, all the algae in Chlorophyceae that were examined exhibited split *cox2* genes and were separated into two groups: *Senedesmus*-like algae that have a mitochondrion-localized *cox2a* gene and a nucleus-localized *cox2b* gene, and *Chlamydomonas*-like algae that have both *cox2a* and *cox2b* genes in the nucleus (Rodríguez-Salinas *et al.*, in press).

The *cox3* gene, encoding subunit III of cytochrome *c* oxidase, also migrated to the nucleus in some lineages within Chlorophyceae. This gene is present in the mitochondrial genome of prasinophytes, ulvophytes, trebouxiophytes and some chlorophytes (Table 8.2). However, it is absent in the mitochondrial DNA of the chlorophycean algae *D. salina*, *C. elongatum*, *C. reinhardtii*, *P. capuana* and in the pedinophycean *P. minor*. In these algae, the *cox3* gene may have migrated to the nuclear genome as a single entity. This has been demonstrated in the case of *Polytomella* sp., *C. reinhardtii* and *V. carteri* (Pérez-Martínez *et al.*, 2000; Pérez-Martínez *et al.*, 2002; Prochnik *et al.*, 2010).

Another OXPHOS enzymatic complex that presents subunits of combined origin (i.e. mitochondrion- and nucleus-encoded) is NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). This is the largest and the most intricate enzyme of the mitochondrial respiratory chain (Efremov & Sazanov, 2011). It is a membrane-bound assembly of approximately 42–43 subunits in *C. reinhardtii* (Cardol *et al.*, 2004). In green algae, genes *nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad5*, and *nad6* are present in all the mitochondrial genomes that have been sequenced (Table 8.2). In contrast, the genes *nad3* and *nad4L* are absent in several chlorophycean mitochondrial genomes, except in *S. obliquus*; these genes, which encode subunits essential for the function and assembly of complex I, also migrated to the nucleus in some algal lineages (Cardol *et al.*, 2006) (Table 8.2).

F₁F₀-ATP synthase (complex V) subunits are encoded by *atp* genes. In chlorophytes, the genes *atp1*, *4*, *6*, *8* and *9*, which encode subunits α , β_2 , α , A6L and *c*, respectively, are typically located in the mitochondrial genome (Table 8.2). Nevertheless, the genes *atp6* and *atp8* are missing from the mitochondrial genomes of several chlorophycean algae. In *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp., the gene *atp6* migrated to the nucleus, while *atp8* seems to have been lost. Therefore, these algae do not encode a single *atp* gene in their mitochondrial genome, an exceptional situation that differs from all other mitochondria-bearing eukaryotes. Note that the subunit composition of the chlorophycean mitochondrial ATP synthase is atypical. Opisthokonts and plants contain an orthodox ATP synthase composed of 14–15 conserved subunits that assemble into a rotor containing subunits γ , δ , ϵ , c_{10} , a catalytic domain formed by three α subunits and three β subunits, and a peripheral stator composed of subunits α , A6L, e , f , g , β_2 , OSCP and F6 (Walker and Dickson, 2006). Nonetheless, biochemical and computational analyses have revealed that the ATP synthase of the chlorophycean algae *C. reinhardtii*, *Polytomella* sp. and *V. carteri* lack several of the genes encoding the subunits of the peripheral arm of the enzyme, which exhibits an atypical composition (Cardol *et al.*, 2005; Van Lis, Mendoza-Hernández, Groth, & Atteia, 2007).

Its constituents are nucleus-encoded subunits, which have been named *Asa1–9* for ATP synthase-associated proteins (Cano-Estrada *et al.*, 2010; Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). However, their evolutionary origin remains obscure, and to date, few homologues have been identified outside the chlorophycean lineage (Lapaille *et al.*, 2010).

3.3.2. Transfer of other DNA elements

The mitochondrial genome of *Vibrio carcheri* is highly enriched with short palindromic sequences. It has been proposed that the original palindromic element first appeared in a mitochondrial intron, afterwards spreading to the chloroplast genome and eventually to the nuclear genome (Smith & Lee, 2009). The mitochondrial genome of *Dunaliella salina*, as well as its plastid genome, has extremely high intron and intergenic DNA densities (Smith *et al.*, 2010).

3.3.3. Recent gene acquisitions

The gene *rtl* was identified in the mitochondrial genome of *C. reinhardtii* and was found to be related to the reverse transcriptase-like part of some fungal mitochondrial introns and plasmids (Boer & Gray, 1988). Although the evolutionary origin of the RTL protein (i.e. retro transcriptase-like) is unknown, this gene has been described exclusively in the mitochondrial genomes of *C. reinhardtii* (Lang *et al.*, 1997) and *Chlamydomonas smithii* (Kroymann & Zetsche, 1998). In contrast to the rest of the mitochondrial encoded proteins, the T nucleotide frequency in the third position is low, suggesting it was recently acquired (Boer & Gray, 1988). We have conducted a BLAST analyses using the *rtl* gene of *C. reinhardtii* (NP_042571). The results reveal that a gene that shares 72% identity is present in *Chlamydomonas incerta* (ABC98218), and intriguingly, that a gene that shares 22% of identity is present in the chloroplast genome of *S. obliquus* (YP_636002). Furthermore, the identity shared between the identified genes and the active site of the RTL of *C. reinhardtii* is 54%. The *rtl* gene seems to be absent from the rest of the sequenced green algae genomes (Rodríguez-Salinas & González-Halphen, 2009).



4. COMPARATIVE GENOMICS AND ACQUISITION OF NEW METABOLIC CAPABILITIES

Studying and comparing genome structure and function will help us to understand how evolutionary forces act on genomes; and thus will shed light

on green algae adaptive dynamics. However, this field is still in its infancy due to the scarce number of sequenced genomes. An immediate application of comparative genomics includes phylogenetic analysis (i.e. the reconstruction of gene transfer events from one generation to another). These analyses will provide a more solid and reliable reconstruction of the events that led to present-day green algal genomes.

Also, the niches inhabited by chlorophytes are either constantly changing or represent extreme environments. The ability of these algae to adapt to new environmental conditions is just beginning to be studied (Carrera-Martinez, Mateos-Sanz, Lopez-Rodas, & Costas, 2011; Collins, 2011; Li, Lu, Xue, & Xie, 2010). Furthermore, the following genomic characteristics, which have been described in some chlorophytes, may help shed light on the subject.

4.1. Ancestral Organelle Genomes as Evidence of Green Plant Evolution

Green algae and land plants comprise the Viridiplantae kingdom, which consists of two phyla: Chlorophyta (green algae) and Streptophyta (charophyte algae and land plants). A link between both groups has been perceived by taxonomists for centuries (Lewis & McCourt, 2004). The identity of the unicellular flagellate ancestor remains unknown. Through chloroplast genome comparison, it has been estimated that 470 MYA the last common ancestor to both phyla transitioned from an aquatic to a land habitat, thus resulting in the land plant ancestor (Lemieux, Otis, & Turmel, 2000; Lewis & McCourt, 2004; Turmel, Otis, & Lemieux, 2006). This hypothesis has been further supported by single-gene phylogenetic analysis, which suggests that the last common ancestor belonged to the group of present-day charophyte algae (Turmel, Otis, & Lemieux, 2003). In addition, these studies indicate that chloroplast genome architecture has been extremely well conserved (Lemieux *et al.*, 2000; Turmel *et al.*, 2006).

Comparison of chlorophycean mitochondrial genomes accompanied by phylogenetic studies are in agreement with the monophyly and early divergence of the Prasinophyceae class. It is believed that this group contains the most primitive forms of green algae (Bullerwell & Gray, 2004). The analyses of the nuclear genomes of two *Micromonas* species have been used as the start point to infer the genetic composition of the last common ancestor between green algae and land plants. For example, *Micromonas* encodes transcription factors that are also encoded in the modern descendants of the

ancestral lineages of land plants (e.g. associated with leaf development), but they are absent in other Prasinophyceae genera (e.g. *Ostreococcus*). Also, genes that encode meiosis-associated proteins (e.g. hydroxyproline-rich glycoproteins, which are expressed exclusively after sexual fusion) have been identified within the *Micromonas* nuclear genome. Nevertheless, none of the members of the Prasinophyceae has been reported to reproduce sexually, as plants do (Worden *et al.*, 2009).

4.2. Evolutionary Mechanisms

Gene and genome duplication have long been considered a major evolutionary force. Since the additional copies are free of selective pressure, they provide a source of evolutionary novelties: new gene functions and expression patterns (Babushok, Ostertag, & Kazazian, 2007). The following alternative outcomes have been suggested for duplicate genes: (1) non-functionalization of one copy (i.e. silencing by degenerative mutations); (2) neo-functionalization of one copy (i.e. acquisition of a novel function and its preservation by natural selection in one copy while the other retains its original function); or (3) sub-functionalization of both copies (i.e. mutation accumulation reduces both gene capacity to the level of the single copy ancestral gene) (Lynch & Conery, 2000). At present, four examples of gene duplication have been described in green algae.

The first two examples are mitochondrial genome duplication within two members of the Prasinophyceae class, *O. tauri* and *Micromonas* sp. The former contains a duplication of a 20-kb segment that encompasses 44% of the full mitochondrial genome. The duplicate segment contains an open reading frame (*orf129*), genes encoding OXPHOS proteins (*cob*, *cox1*, *atp4*, *atp8*, *nad4L*, and *ymf39*), and ribosomal protein coding genes (*ml*, *ms*, *mi*) (Robbens *et al.*, 2007). In the latter, the duplicate segment is larger and contains genes encoding OXPHOS proteins (*nad1*, *nad6*, *cox1*, *atp4*, *atp6*, *atp8*) and ribosomal protein coding genes (*ml* and *ms*) (NC_012643). Future studies will assess the sequence identity as well as the functionality of each duplicated gene.

The last two examples have been described in members of the *Dunaliella* genus (Chlorophyceae). *D. viridis* contains an inverted duplication of the gene *DvSPT1* within its nuclear genome. This gene encodes a sodium-dependent phosphate transporter. Both genes have the same number of exons and introns and share a sequence identity of 99.7%. When subjected to different salt concentrations, expression levels were higher for the original

gene under low salt concentrations, and for the duplicate copy under high salt concentrations (Guan, Meng, Sun, Xu, & Song, 2008). The same scenario has been reported for the duplicated carbonic anhydrase gene *DCA1* in *D. salina* (Li *et al.*, 2010).



5. PERSPECTIVES

The field of genomics has provided new ways to uncover and understand evolutionary mechanisms of mitochondrial genomes, as presented above. Genomics provides insights into different aspects of organism and cell function, i.e. biochemistry, genetics, cellular biology, etc. The different approaches have allowed us to study the remarkable mobility from and to the genomes of green algae; this will help our understanding of their metabolic plasticity. Mitochondria are not alone within green cells; they have coexisted with chloroplasts for more than a billion years. Within this framework, complex interchanges at the genomic level, and interactions at the metabolic level, have been established (Matsuo, Hachisu, Tabata, Fukuzawa, & Obokata, 2011). Adaptive advantages may arise from these successful interactions, representing unique opportunities to gain insight into the transition from single-cell organisms to multicellular photosynthetic organisms. It will thus be interesting in the future to study the metabolism of these two organelles from a co-evolutionary perspective (i.e. events following the endosymbiosis that gave rise to the chloroplast). An interesting example is green algae of the genus *Polytomella*. They lack functional chloroplasts; nonetheless, they may still contain photosynthetic genes (Rodríguez-Salinas and González-Halphen, unpublished observations). The new -omics approaches (May *et al.*, 2008; Wienkoop *et al.*, 2010) and recently developed techniques such as deep sequencing of RNA (Xiong *et al.*, 2012) molecules, and the identification of thousands of proteins by high throughput mass spectrometric analyses will play a key role.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research in the laboratory of C.R. is supported by the Fonds National de la Recherche Scientifique (grant numbers 1.5.255.08, 2.4.601.08 and 2.4567.11), by Sunbiopath, an FP7-funded project (GA 245070), Acción de la Recherche Concertée ARC07/12-04 and Fonds Spéciaux du Conseil de la Recherche from the University of Liege. Research in the laboratory of D.G.-H. is partially supported by grants 128110 (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, México) and IN203311-3 (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA-UNAM, México). E.R.-S. received a fellowship (221018)

from CONACYT to carry on PhD studies at the program of Biomedical Sciences, UNAM. The authors acknowledge the technical support of Miriam Vázquez-Azevedo on the ongoing research projects.

REFERENCES

- Adams, K. L., Ong, H. C., & Palmer, J. D. (2001). Mitochondrial gene transfer in pieces: fission of the ribosomal protein gene *rpl2* and partial or complete gene transfer to the nucleus. *Molecular Biology and Evolution*, *18*, 2289–2297.
- Adams, K. L., & Palmer, J. D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *29*, 380–395.
- Adams, K. L., Song, K., Roesler, P. G., Nugent, J. M., Doyle, J. L., Doyle, J. J., et al. (1999). Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 13863–13868.
- Atteia, A., Adrait, A., Brugière, S., Tardif, M., van Lis, R., Deusch, O., et al. (2009). A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the organelle and on the nature of the alpha-proteobacterial mitochondrial ancestor. *Molecular Biology and Evolution*, *26*, 1533–1548.
- Aoyama, H., Hagiwara, Y., Misumi, O., Kuroiwa, T., & Nakamura, S. (2006). Complete elimination of maternal mitochondrial DNA during meiosis resulting in the paternal inheritance of the mitochondrial genome in *Chlamydomonas* species. *Protoplasts*, *228*, 232–242.
- Bahushok, D. V., Ostentag, E. M., & Kazanian, H. H., Jr. (2007). Current topics in genome evolution: molecular mechanisms of new gene formation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*, 542–554.
- Barbieri, M. R., Larosa, V., Nouet, C., Subrahmanian, N., Remacle, C., & Hamel, P. P. (2011). A forward genetic screen identifies mutants deficient for mitochondrial complex I assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, *188*, 349–358.
- Beckers, M. C., Munaut, C., Minet, A., & Matagne, R. F. (1991). The fate of mtDNAs of mt+ and mt- origin in gametes and zygotes of *Chlamydomonas*. *Current Genetics*, *20*, 239–243.
- Belanger, A. S., Brouard, J. S., Charlebois, P., Ouis, C., Lemieux, C., & Turmel, M. (2006). Distinctive architecture of the chloroplast genome in the chlorophycean green alga *Sargassum helveticum*. *Molecular Genetics and Genomics*, *276*, 464–477.
- Bennoun, P., Delosme, L., & Kück, U. (1991). Mitochondrial genetics of *Chlamydomonas reinhardtii*: resistance mutations marking the cytochrome *b* gene. *Genetics*, *127*, 335–343.
- Boer, P. H., & Gray, M. W. (1988). Genes encoding a subunit of respiratory NADH dehydrogenase (ND1) and a reverse transcriptase-like protein (RTL) are linked to ribosomal RNA gene pieces in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. *EMBO Journal*, *7*, 3501–3508.
- Bonnefoy, N., Remacle, C., & Fox, T. D. (2007). Genetic transformation of *Saxidomus covei* and *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. *Methods in Cell Biology*, *80*, 525–548.
- Boynton, J. E., Harris, E. H., Burkhardt, B. D., Lamerson, P. M., & Gillham, N. W. (1987). Transmission of chloroplast and mitochondrial genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*, 2391–2395.
- Brouard, J. S., Ouis, C., Lemieux, C., & Turmel, M. (2008). Chloroplast DNA sequence of the green alga *Oedogonium cariacum* (Chlorophyceae): unique genome architecture,

- derived characters shared with the Chaetophorales and novel genes acquired through horizontal transfer. *BMC Genomics*, 9, 290.
- Brouard, J. S., Ouis, C., Lemieux, C., & Turmel, M. (2010). The exceptionally large chloroplast genome of the green alga *Floydiella tenax* illuminates the evolutionary history of the Chlorophyceae. *Genome Biology and Evolution*, 2, 240–256.
- Bullerwell, D. E., & Gray, M. W. (2004). Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 528–534.
- Cano-Estrada, A., Vázquez-Acevedo, M., Villavicencio-Queijeiro, A., Figueroa-Martínez, F., Miranda-Astudillo, H., Cordeiro, Y., et al. (2010). Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797, 1439–1448.
- Cardol, P., González-Halphen, D., Reyes-Prieto, A., Baurain, D., Matagne, R. F., & Remacle, C. (2005). The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the genome sequencing project. *Plant Physiology*, 137, 447–459.
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devriese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R. F., & Remacle, C. (2004). Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1663, 212–224.
- Cardol, P., Lapaille, M., Minet, P., Matagne, R. F., Franck, F., & Cardol, P. (2006). ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus-encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for the activity and assembly of the enzyme. *Eukaryotic Cell*, 5, 1460–1467.
- Cardon, Z. G., Gray, D. W., & Lewis, L. A. (2008). The green algal underground: evolutionary secrets of desert cells. *BioScience*, 58, 114–122.
- Carrera-Martínez, D., Mateos-Sanz, A., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2011). Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquatic Toxicology*, 101, 342–350.
- Colin, M., Dorthu, M. P., Duby, F., Remacle, C., Dinant, M., Wolwertz, M. R., et al. (1995). Mutations affecting the mitochondrial genes encoding cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome b of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics*, 249, 179–184.
- Collins, S. (2011). Competition limits adaptation and productivity in a photosynthetic alga at elevated CO₂. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278, 247–255.
- de Cambiaire, J. C., Ouis, C., Lemieux, C., & Turmel, M. (2006). The complete chloroplast genome sequence of the chlorophyte green alga *Saundersia obliqua* reveals a compact gene organization and a biased distribution of genes on the two DNA strands. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 37.
- de Koning, A. P., & Keeling, P. J. (2006). The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicopodium* sp. is highly reduced and structured. *BMC Biology*, 4, 12.
- Dorthu, M. P., Remy, S., Michel-Wolwertz, M. R., Colleaux, L., Breyer, D., Beckers, M. C., et al. (1992). Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology*, 18, 759–772.
- Duby, F., & Matagne, R. F. (1999). Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mtDNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nd4* and the 3' end of *nd5*. *The Plant Cell*, 11, 115–125.
- Efimov, R. G., & Sazanov, L. A. (2011). Respiratory complex I: 'steam engine' of the cell? *Current Opinion in Structural Biology*, 21, 532–540.

- Fan, J., & Lee, R. W. (2002). Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella parva*: two linear DNA molecules with homologous inverted repeat termini. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 999–1007.
- Funes, S., Davidson, E., Reyes-Prieto, A., Magallón, S., Herion, P., King, M. P., et al. (2002). A green algal apicoplast ancestor. *Science*, 298, 2155.
- Funes, S., Franzén, L. G., & González-Halphen, D. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* the model of choice to study mitochondria from unicellular photosynthetic organisms. *Methods in Molecular Biology*, 372, 137–149.
- Garbary, D. J., Bourques, G., Herman, T. B., & McNeil, J. A. (2007). Epizotic algae from freshwater turtles in Nova Scotia. *Journal of Freshwater Ecology*, 22, 677–685.
- Gawryluk, R. M., & Gray, M. W. (2009). A split and rearranged nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial succinate dehydrogenase in Euglenozoa. *BMC Research Notes*, 2, 16.
- Gawryluk, R. M., & Gray, M. W. (2010). An ancient fission of mitochondrial Cox1. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 7–10.
- Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283, 1476–1481.
- Grossman, A. R., Harris, E. E., Hauser, C., Lefebvre, P. A., Martinez, D., Rokhsar, D., et al. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryotic Cell*, 2, 1137–1150.
- Guan, Z., Meng, X., Sun, Z., Xu, Z., & Song, R. (2008). Characterization of duplicated *Dunaliella salina* SPT1 genes provides insights into early gene divergence after duplication. *Gene*, 423, 36–42.
- Hayashi-khimani, Y., Ohama, T., Kawatsu, Y., Nakamura, K., & Osawa, S. (1996). UAG is a sense codon in several chlorophycean mitochondria. *Current Genetics*, 30, 29–33.
- Herron, M. D., Hackett, J. D., Aylward, F. O., & Michod, R. E. (2009). Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3254–3258.
- Kerney, R., Kim, E., Hangarter, R. P., Heiss, A. A., Bishop, C. D., & Hall, B. K. (2011). Intracellular invasion of green algae in a salamander host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 6497–6502.
- Kroymann, J., & Zerche, K. (1998). The mitochondrial genome of *Chlorella elongata* inferred from the complete sequence. *Journal of Molecular Evolution*, 47, 431–440.
- Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., et al. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387, 493–497.
- Lapaille, M., Escobar-Ramírez, A., Degand, H., Baurain, D., Rodríguez-Salinas, E., Coosemans, N., et al. (2010). Atypical subunit composition of the chlorophycean mitochondrial FOF1 ATP synthase and the role of *Asa7* in stability and oligomycin resistance of the enzyme. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 1630–1644.
- Larosa, V., Coosemans, N., Motte, P., Bonnefoy, N., & Remacle, C. (2012). Reconstruction of a human mitochondrial complex I mutation in the unicellular green alga *Chlamydomonas*. *Plant Journal* 70, 759–768.
- Lemieux, C., Otis, C., & Turmel, M. (2000). Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature*, 403, 649–652.
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, 91, 1535–1556.
- Lewis, L. A., & Müller-Parker, G. (2004). Phylogenetic placement of “zoochlorellae” (Chlorophyta), algal symbiont of the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *The Biological Bulletin*, 207, 87–92.
- Li, J., Lu, Y., Xue, L., & Xie, H. (2010). A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Molecular Biology Reports*, 37, 1143–1154.

- Lowenstein, T. K., Schubert, B. A., & Timofeeff, M. N. (2011). Microbial communities in fluid inclusions and long-term survival in halite. *GSA Today*, 21, 4–9.
- Lüttge, U., & Büdel, B. (2010). Resurrection kinetics of photosynthesis in desiccation-tolerant terrestrial green algae (Chlorophyta) on tree bark. *Plant Biology (Stuttgart, Germany: Online)*, 12, 437–444.
- Lynch, M., & Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290, 1151–1155.
- Mallet, M. A., & Lee, R. W. (2006). Identification of three distinct *Polytomella* lineages based on mitochondrial DNA features. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53, 79–84.
- Martin, W., & Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 392(6671), 37–41, Mar 5.
- Matagne, R. F., Michel-Wolwertz, M. R., Munaut, C., Duyckaerts, C., & Sluse, F. (1989). Induction and characterization of mtDNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Biology*, 108, 1221–1226.
- Matsuo, M., Hachisu, R., Tabata, S., Fukuzawa, H., & Obokata, J. (2011). Transcriptome analysis of respiration-responsive genes in *Chlamydomonas reinhardtii*: mitochondrial retrograde signaling coordinates the genes for cell proliferation with energy-producing metabolism. *Plant Cell Physiology*, 52, 333–343.
- Maul, J. E., Lilly, J. W., Cui, L., de Pamphilis, C. W., Miller, W., Harris, E. H., et al. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *The Plant Cell*, 14, 2659–2679.
- May, P., Wienkoop, S., Kempa, S., Usadel, B., Rupprecht, C., Weiss, J., et al. (2008). Metabolomics- and proteomics-assisted genome annotation and analysis of the draft metabolic network of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 179, 157–166.
- Melkonian, M. (1990). "Phylum Chlorophyta. Introduction to the Chlorophyta". In L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, & D. J. Chapman (Eds.), *Handbook of Protocista* (pp. 597–599). Boston: Jones & Bartlett.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., et al. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318, 245–250.
- Michaelis, G., Vahrenholz, C., & Pratz, E. (1990). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Molecular and General Genetics*, 223, 211–216.
- Moestrup, Ø. 2006. Algal Taxonomy: Historical Overview. eLS. (Wiley Online Library).
- Moser, J. L., Moser, A. G., & Brock, T. D. (1977). Photosynthesis in the snow: the alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 13, 22–27.
- Nakamura, S., Aoyama, H., & Van Woese, R. (2003). Strict paternal transmission of mitochondrial DNA of *Chlamydomonas* species explained by selection against maternal nucleoids. *Plastidoma*, 221, 205–210.
- Nakamura, S. (2010). Paternal inheritance of mitochondria in *Chlamydomonas*. *Journal of Plant Research*, 123, 163–170.
- Nakayama, T., Marin, B., Kranz, H. D., Surek, B., Husce, V. A. R., Inouye, I., et al. (1998). The basal position of scaly green flagellates among the green algae (Chlorophyta) is revealed by analysis of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Protist*, 149, 367–380.
- Nedelcu, A. M., & Lee, R. W. (1998). Short repetitive sequences in green algal mitochondrial genomes: potential roles in mitochondrial genome evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 690–701.
- Nedelcu, A. M., Lee, R. W., Lemieux, C., Gray, M. W., & Burger, G. (2000). The complete mitochondrial DNA sequence of *Saundersium obliquus* reflects an intermediate

- stage in the evolution of the green algal mitochondrial genome. *Genome Research*, 10, 819–831.
- Nishihara, N., Horiike, S., Takahashi, T., Kosaka, T., Shigenaka, Y., & Hosoya, H. (1998). Cloning and characterization of endosymbiotic algae isolated from *Paramecium bursaria*. *Protoplasts*, 203, 91–99.
- Palerik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jørgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otiillar, R., Merchant, S. S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., Vallon, O., Piganeau, G., Janček, S., Heijde, M., Jabbari, K., Bowler, C., Lohr, M., Robbins, S., Werner, G., Dubchak, I., Pazour, G. J., Ren, Q., Paulsen, I., Delwiche, C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Van de Peer, Y., Moreau, H., & Grigoriev, I. V. (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7705–7710.
- Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., Tolkunova, E., Funes, S., Clams, M. G., Davickon, E., et al. (2000). Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of *Chlamydomonas* algae. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 30144–30152.
- Pérez-Martínez, X., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Funes, S., Tolkunova, E., d'Alayer, J., et al. (2001). Subunit II of cytochrome c oxidase in *Chlamydomonas* algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 11302–11309.
- Pérez-Martínez, X., Funes, S., Tolkunova, E., Davickon, E., King, M. P., & González-Halphen, D. (2002). Structure of nuclear-localized *cox3* genes in *Chlamydomonas reinhardtii* and in its colorless close relative *Polytomella* sp. *Current Genetics*, 40, 399–404.
- Pombert, J. F., Lemieux, C., & Turmel, M. (2006). The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis vixidis* reveals a distinctive quadripartite architecture in the chloroplast genome of early diverging ulvophytes. *BMC Biology*, 4, 3.
- Pombert, J. F., Ouis, C., Lemieux, C., & Turmel, M. (2004). The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Pseudodictyonium akineum* (Ulvophyceae) highlights distinctive evolutionary trends in the chlorophyta and suggests a sister-group relationship between the Ulvophyceae and Chlorophyceae. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 922–935.
- Pombert, J. F., Ouis, C., Lemieux, C., & Turmel, M. (2005). The chloroplast genome sequence of the green alga *Pseudodictyonium akineum* (Ulvophyceae) reveals unusual structural features and new insights into the branching order of chlorophyte lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1903–1918.
- Pombert, J. F., & Keeling, P. J. (2010). The mitochondrial genome of the entomoparasitic green alga *Heliospondium*. *PLoS ONE*, 5, e8954.
- Poole, A. M., & Penny, D. (2006). Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *BioEssays*, 29, 74–84.
- Popescu, C. E., & Lee, R. W. (2007). Mitochondrial genome sequence evolution in *Chlamydomonas*. *Genetics*, 175, 819–826.
- Prochnik, S. E., Umen, J., Nedelcu, A. M., Hallmann, A., Müller, S. M., et al. (2010). Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carterii*. *Science*, 329, 223–226.
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U. G., & Melkonian, M. (2001). Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist*, 152, 265–300.
- Pröschold, T. and Leliart, F. 2007. 'Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches'. In *Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of the*

- Algae Systematics, Edited by: Brodie, J. and Lewis, J. 123–153. London: Taylor & Francis.
- Randolph-Anderson, B. L., Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Johnson, A. M., Dordhu, M. P., et al. (1993). Further characterization of the respiratory deficient *dup1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Molecular and General Genetics*, 236, 235–244.
- Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M., & Bonnefoy, N. (2006). High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 4771–4776.
- Robbens, S., Derelle, E., Ferraz, C., Wuyts, J., Moreau, H., & Van de Peer, Y. (2007). The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 956–968.
- Rodriguez-Espeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., et al. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Current Biology*, 15, 1325–1330.
- Rodriguez-Salinas, E., & González-Halphen, D. (2009). Los genomas mitocondriales ¿Qué nos dicen sobre la evolución de las algas verdes? *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 44–57.
- Rodriguez-Salinas, E., Riveros-Rosas, H., Li, Z., Fučíková, K., Brand, J. J., Lewis, L. A., & et al. Lineage-specific fragmentation and nuclear relocation of the mitochondrial *cox2* gene in chlorophycean green algae (Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64, 166–176.
- Rolland, N., Atreia, A., Decottignies, P., Garin, J., Hippler, M., Kreimer, G., et al. (2009). *Chlamydomonas* proteomics. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 285–291.
- Rubio, M. A., & Hopper, A. K. (2011). Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles. *WIREs RNA*, 2, 802–817.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14, 225–274.
- Salinas, T., Duchêne, A. M., & Maréchal-Drouard, L. (2008). Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 320–329.
- Sieber, F., Plácido, A., El Farouk-Ameqrane, S., Duchêne, A. M., & Maréchal-Drouard, L. (2011). A protein shuttle system to target RNA into mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 39, e96.
- Smith, D. R., & Lee, R. W. (2008). Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella opauzei*: a linear molecule with an unprecedented GC content. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 487–496.
- Smith, D. R., & Lee, R. W. (2009). The mitochondrial and plastid genomes of *Volvox carterii*: bloated molecules rich in repetitive DNA. *BMC Genomics*, 10, 132.
- Smith, D. R., Hua, J., & Lee, R. W. (2010). Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Polytomella*. *Current Genetics*, 56, 427–438.
- Smith, D. R., Lee, R. W., Cushman, J. C., Magnuson, J. K., Tran, D., & Polle, J. E. (2010). The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. *BMC Plant Biology*, 10, 83.
- Tamames, J. (2001). Evolution of gene order conservation in prokaryotes. *Genome Biology*, 2, 20, 1–20.
- The Genetic Codes-NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi#SG16>.
- Trainor, F. R., & Gladych, R. (1995). Survival of algae in a desiccated soil: a 35-year study. *Phycologia*, 34, 191–192.
- Turmel, M., Lemieux, C., Burger, G., Lang, B. F., Otis, C., Plante, I., et al. (1999). The complete mitochondrial DNA sequences of *Nephroselmis olivacea* and *Pedinomonas minor*.

- Two radically different evolutionary patterns within green algae. *The Plant Cell*, *11*, 1717–1730.
- Turmel, M., Otis, C., & Lemieux, C. (1999). The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea* insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 10248–10253.
- Turmel, M., Otis, C., & Lemieux, C. (2003). The mitochondrial genome of *Chlorella vulgaris*: insights into the mitochondrial DNA architecture of the last common ancestor of green algae and land plants. *The Plant Cell*, *15*, 1888–1903.
- Turmel, M., Otis, C., & Lemieux, C. (2006). The chloroplast genome sequence of *Chlorella vulgaris* sheds new light into the closest green algal relatives of land plants. *Molecular Biology and Evolution*, *23*, 1324–1338.
- Turmel, M., Otis, C., & Lemieux, C. (2010). A deviant genetic code in the reduced mitochondrial genome of the picoplanktonic green alga *Pyrodicticum prostratum*. *Journal of Molecular Evolution*, *70*, 203–214.
- Umen, J. G., & Goodenough, U. (2001). Chloroplast DNA methylation and inheritance in *Chlamydomonas*. *Genes and Development*, *15*, 2585–2597.
- Vahrenholz, C., Riemen, G., Prage, E., Dujon, B., & Michaelis, G. (1993). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Current Genetics*, *24*, 241–247.
- van den Hoek, C., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press Cambridge, 623 pp.
- van Ertten, J. L., & Dunigan, D. D. (2012). Chloroviruses: not your everyday plant virus. *Trends in Plant Science*, *17*, 1–8.
- van Lix, R., Mendoza-Hernández, G., Groth, G., & Atteia, A. (2007). New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the chlamydomonad alga *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, *144*, 1190–1199.
- Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remade, C., & González-Halphen, D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *38*, 271–282.
- Walker, J. E., & Dickson, V. K. (2006). The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1757*, 286–296.
- Wienkoop, S., Weis, J., May, P., Kempa, S., Sörgang, et al. (2010). Targeted proteomics for *Chlamydomonas reinhardtii* combined with rapid subcellular protein fractionation, metabolomics and metabolic flux analyses. *Molecular Biotechnology*, *6*, 1018–1031.
- Wolff, G., Plante, I., Lang, B. F., Küdk, U., & Burger, G. (1994). Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii*. Gene content and genome organization. *Journal of Molecular Biology*, *237*, 75–86.
- Worden, A. Z., Lee, J. H., Mock, T., Rouze, P., Simmons, M. P., et al. (2009). Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science*, *324*, 268–272.
- Xiong, J., Lu, X., Zhou, Z., Chang, Y., Yuan, D., Tian, M., et al. (2012). Transcriptome analysis of the model Protozoan, *Tetrahymena thermophila*, using deep RNA sequencing. *PLoS ONE*, *7*, e30630.
- Yamasaki, T., Kurokawa, S., Watanabe, K. I., Iwata, K., & Ohama, T. (2005). Shared molecular characteristics of successfully transformed mitochondrial genomes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology*, *58*, 515–527.

Atypical Subunit Composition of the Chlorophycean Mitochondrial F_1F_0 -ATP Synthase and Role of Asa7 Protein in Stability and Oligomycin Resistance of the Enzyme

Marie Lapaille,¹ Adelma Escobar-Ramírez,² Hervé Degand,³ Denis Baurain,⁴ Elizabeth Rodríguez-Salinas,² Nadine Coosemans,¹ Marc Boutry,³ Diego Gonzalez-Halphen,² Claire Remacle,¹ and Pierre Cardol^{*1}

¹Genetics of Microorganisms, Department of Life Sciences, Université de Liège, Belgium

²Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México

³Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

⁴Unit of Animal Genomics, GIGA-R and Faculty of Veterinary Medicine, Université de Liège, Belgium

*Corresponding author: E-mail: Pierre.cardol@ulg.ac.be

Associate editor: Richard Thomas

Research article

Abstract

In yeast, mammals, and land plants, mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase (complex V) is a remarkable enzymatic machinery that comprises about 15 conserved subunits. Peculiar among eukaryotes, complex V from Chlamydomonadales algae (order of chlorophycean class) has an atypical subunit composition of its peripheral stator and dimerization module, with nine subunits of unknown evolutionary origin (Asa subunits). In vitro, this enzyme exhibits an increased stability of its dimeric form, and in vivo, *Chlamydomonas reinhardtii* cells are insensitive to oligomycins, which are potent inhibitors of proton translocation through the F_0 moiety.

In this work, we showed that the atypical features of the Chlamydomonadales complex V enzyme are shared by the other chlorophycean orders. By biochemical and in silico analyses, we detected several atypical Asa subunits in *Scenedesmus obliquus* (Sphaeropleales) and *Chlorococcum ellipsoideum* (Chlorococcales). In contrast, complex V has a canonical subunit composition in other classes of Chlorophytes (Trebouxiophyceae, Prasinophyceae, and Ulvophyceae) as well as in Streptophytes (land plants), and in Rhodophytes (red algae). Growth, respiration, and ATP levels in Chlorophyceae were also barely affected by oligomycin concentrations that affect representatives of the other classes of Chlorophytes. We finally studied the function of the Asa7 atypical subunit by using RNA interference in *C. reinhardtii*. Although the loss of Asa7 subunit has no impact on cell bioenergetics or mitochondrial structures, it destabilizes in vitro the enzyme dimeric form and renders growth, respiration, and ATP level sensitive to oligomycins.

Altogether, our results suggest that the loss of canonical components of the complex V stator happened at the root of chlorophycean lineage and was accompanied by the recruitment of novel polypeptides. Such a massive modification of complex V stator features might have conferred novel properties, including the stabilization of the enzyme dimeric form and the shielding of the proton channel. In these respects, we discuss an evolutionary scenario for F_1F_0 -ATP synthase in the whole green lineage (i.e., Chlorophyta and Streptophyta).

Key words: *chlamydomonas*, algae, mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase, enzyme evolution, atypical subunits.

Introduction

The F_1F_0 -ATP synthase is a ubiquitous rotary motor enzyme that couples proton flow through its membrane-embedded F_0 channel to ATP synthesis that occurs on its F_1 moiety (Boyer 2000). In fungi, mammals, and flowering plants, mitochondrial ATP synthase is composed of at least 14–15 conserved subunits of dual genetic origin: Up to five subunits are usually encoded by the mitochondrial genomes, whereas the remainder are nuclear gene products. Altogether, they build the F_1 catalytic domain, the F_0 proton pore, and two stalks that link and hold F_1 to F_0 . One of these stalks is thought to act as a rotor and the other as a peripheral stator (Weber and Senior 2003; Cardol et al. 2005; Vázquez-Acevedo et al. 2006; Wittig and Schagger 2008).

In contrast, biochemical and computational analyses revealed that the enzyme from three chlorophycean algae belonging to the Chlamydomonadales order (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Polytomella* sp. *Pringsheim* 198.80, and *Volvox carteri*) lacks eight subunits (*b*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*, *F6*, and *IF₁*) that are conserved in mammals and fungi and participate in the building of the peripheral stalk and in the dimerization of the enzyme. Instead, the algal enzyme contains nine nucleus-encoded subunits of unknown evolutionary origin, which were named Asa1 to 9 for “ATP Synthase-Associated” proteins (Cardol et al. 2005; Vázquez-Acevedo et al. 2006; Van Lis et al. 2007). It was thus hypothesized that Asa subunits build a novel peripheral stator and dimerization module architecture. Indeed, electron microscopy studies revealed that the

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journal.permissions@oxfordjournals.org

1630 Mol. Biol. Evol. 27(7):1630–1644. 2010 doi:10.1093/molbev/msq049 Advance Access publication February 15, 2010

Downloaded from <http://mbe.oxfordjournals.org/> by guest on June 21, 2012

structures of the ATP synthase dimeric forms of beef heart (Minauro-Sanmiguel et al. 2005) and *Polytomella* (Dudkina et al. 2005) differ, the latter exhibiting two large, robust, protruding arms that extend from the membrane to the upper region of the F_1 moieties. Moreover, in contrast to other known F_1F_0 -ATP synthases, the dimeric complex V of chlorophycean algae is highly stable in vitro (Van Lis et al. 2003, 2007; Vázquez-Acevedo et al. 2006; Villavicencio-Queijeiro et al. 2009). However, because of the lack of information on ATP synthase subunit composition in other green organisms (i.e., between flowering plants and Chlamydomonadales), the question arose to know whether these Asa subunits were genuinely atypical components rather than highly divergent homologs of classical complex V proteins. In this work, we first investigated the subunit composition of mitochondrial ATP synthase in the green photosynthetic organisms, with emphasis on the green algal phylum (i.e., Chlorophyta). Our data allowed us to propose an evolutionary scenario for F_1F_0 -ATP synthase diversification. To uncover novel specific properties conferred by the atypical subunits in Chlorophyceae, we investigated the role of the 19.5-kDa subunit (Asa7) by inactivating its gene expression in *C. reinhardtii*. We found that the silencing of ASA7 destabilizes the dimeric enzyme complex in vitro and renders cell growth, respiration, and ATP level sensitive to oligomycins.

Materials and Methods

Strain and Growth Conditions

The *C. reinhardtii* strain used in this study is the *cw15 arg7-8 mt⁺* mutant. This strain lacks a cell wall and is auxotroph for arginine because of a mutation in the ARG7 gene coding for argininosuccinate lyase (Debuchy et al. 1989). The other Chlorophyta used in this work originated from axenic cultures available at the University of Göttingen (Sammlung von Algenkulturen [SAG], Germany): *Chlorococcum ellipsoideum* (63.80), *Uronema acuminata* (33.86), *Chlamydomonas moewusii* (21.90), *Chlorogonium elongatum* (12–2b), *Scenedesmus obliquus* (276–3b), *Chlorella sarakinia* (211–31), *Chlorella vulgaris* (211–11b), *Nannochloris* sp. (251–2), *Coccomyxa pringsheimii* (216.7), *Leptospira obovata* (445–1), *Pseudonocardium basilense* (466–1), *Gloettilopsis paucicellulare* (463.1), *Ulothrix fimbriata* (36.86), *Micromonas pusilla* (39.85), and *Tetraselmis chuii* (8–6).

Cells were routinely grown in liquid or on solid agar medium under moderate light (50- μ mol photon $m^{-2} s^{-1}$) at 25 °C. Tris-minimal-phosphate medium (TMP) supplemented or not with acetate (TAP, 5 or 17 mM) was used for cultivating the algae (Harris 1989), except for *T. chuii* and *M. pusilla* that were grown on solid Marine medium (Difco Marine Broth 2216, BD, United States). Biomass calculated as the product of the cell density by the mean volume of cells is proportional to the turbidity (A_{750nm}). Both parameters were determined using a Coulter counter (Coulter electronics, Harpenden Herts, United Kingdom).

Construction of Plasmid pASA7-RNAi (4.08 kbp)

Escherichia coli DH5 α was used for cloning and *E. coli* transformants were grown in LB medium in the presence of ampicillin (50 μ g ml^{-1}) at 37 °C. The pNB1 plasmid (2,895 bp) was used to express double-stranded RNA (dsRNA). A NIA1/TUB1 promoter was inserted in the *Xba*I and *Hind*III sites of the pUC19 vector (Cardole et al. 2006). An ASA7 cDNA (287 bp) and the corresponding genomic (934-bp) fragment were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using as forward primer ASA7-RNAi-1F (5'-AGCT-TAGCACCTAGTCGAA-3') and as reverse primers ASA7-RNAi-2R (5'-CGTCAGTGTGAGCAGGTAGT-3') and ASA7-RNAi-3R (5'-GCCCGGTAGTAGTAATCCTT-3'), respectively. The oligonucleotides contained *Clal*/*Hind*III (forward) or *Hind*III/*Nco*I (reverse) restriction sites at their 5' ends for further constructions. These PCR fragments were cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega) to obtain pASA7-13 (ASA7-RNAi-1F/ASA7-RNAi-2R cDNA) and pASA7-3 (ASA7-RNAi-1F/ASA7-RNAi-3R genomic), respectively. The excised *Hind*III fragment of pASA7-13 was inserted into the pNB1 plasmid, and the construct with inverse orientation of ASA7-RNAi-1F/ASA7-RNAi-2R fragment was selected by a PCR analysis to obtain pASA7-AS. The *Clal*-*Nco*I fragment of pASA7-3 was then inserted into the *Clal*-*Nco*I site of pASA7-AS, giving the plasmid pASA7-RNAi (where RNAi is RNA interference), used for RNA inactivation of ASA7.

Transformation of *C. reinhardtii*

Transformation of the *C. reinhardtii* *cw15 arg7-8 mt⁺* strain was carried out using the glass-bead method (Kindle 1990) with 4 μ g of plasmid pRNAi (linearized with *Sac*I) and 1 μ g of pASL, linearized with *Bam*HI. This pASL plasmid bears the *Chlamydomonas* ARG7 gene encoding for the argininosuccinate lyase (Debuchy et al. 1989) and is used as a selectable marker. Prototroph transformants were selected on TAP agar plates. The presence of sequences belonging to the right and to the left part of the RNAi plasmids in the transformants was checked by PCR with primers hybridizing with the ASA7 sequences and the vector (universal primers 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' and 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') on a total nucleic acid extract prepared according to standard procedures (Newman et al. 1990) directly on algal colonies as described in Remacle et al. (2006). The stability of the phenotype observed for the transformants mentioned in this study was confirmed 2 years after their original isolation.

RNA Analyses

Total RNA (15 μ g) prepared according to Newman et al. (1990) was separated on 0.8% agarose-formaldehyde gels and transferred onto Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia Biotech). Digoxigenin-labeled PCR products of cDNA fragments were used as gene probes and detected with antidigoxigenin-AP conjugates and CDP-Star as substrate (Roche, Basel, Switzerland). Hybridization and washing steps were performed according to standard protocols. ASA7-RNAi-1F/ASA7-RNAi-2R and ATP2-RNAi-1F

(GTGGATGTCGGTTTCG)/ATP2-RNAi-2R (CCGGTCAC-CAGGATCT) primers were used to synthesize the probe for detection of *Asa7* and *ATP2* transcripts, respectively.

Protein Analyses

Chlamydomonas reinhardtii, *S. obliquus*, and *C. ellipsoideum* crude total membrane fractions were obtained according to Remacle et al. (2001). For *S. obliquus*, a nebulizer (BioNeb, Cell disruption System, Glas-Col) was used for cell disruption prior to sonication. Crude mitochondrial fraction was obtained according to Cardol et al. (2002) and loaded onto a discontinuous Percoll gradient (13%/21%/45% in mannitol-EDTA-Tris (MET) Buffer [280 mM mannitol, 10 mM Tris-HCl pH 7, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.1% BSA]). Purified mitochondria were recovered at the 21%/45% interface and washed twice in MET buffer by a 10-min centrifugation at $11,000 \times g$. The final pellet was resuspended in 20-mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES-KOH) (pH 7.2), 150-mM mannitol, and 4-mM $MgCl_2$. The protein content was determined by the Bradford method (Bradford 1976). To conduct Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analyses (Schägger and Von Jagow 1991), protein complexes were first solubilized in the presence of either *N*-dodecyl- β -D-maltoside or Triton X-100, 375 mM 6-aminohexanoic acid, 250 mM EDTA, and 25 mM Bis-Tris, pH 7.0, and centrifuged for 20 min at $15,000 \times g$ at 4 °C to remove insoluble matter. 0.4% (w/v) sodium taurodeoxycholate was then added to the supernatant prior to separation by electrophoresis on a 4–12% polyacrylamide gradient BN gel. ATP synthase activity was detected by incubating the gel in 50 mM HEPES, pH 8.0, containing 10 mM ATP and 30 mM $CaCl_2$. Coomassie blue staining and the second dimensional Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedure were performed as described in Cardol et al. (2004). The molecular size of the proteins was calculated by comparison with known markers (PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, Ontario, Canada). For Western blot analysis, protein extracts were loaded onto 10% SDS gels and electroblotted according to standard protocols onto polyvinylidene fluoride membranes (Amersham GE Healthcare). Detection was performed using a BM Chemiluminescence Western blotting kit (Roche, Basel, Switzerland) with anti-rabbit peroxidase-conjugated antibodies. We used rabbit sera obtained against *Polytomella* sp. *Pringsheim* 798.80 *Atp2* (1200,000) or *C. reinhardtii* *Asa7* (150,000) (Genscript, Piscataway, NJ).

ATP Determination

ATP was extracted according to Gans and Rebeille (1990). ATP cellular level was determined using the Enliten luciferase/luciferin kit (Promega, Madison, WI).

Oxygen Evolution

Cells grown mixotrophically in TAP liquid medium were sampled during the exponential phase. Dark respiration rates were measured using a Clark Electrode (Hansatech Instruments, King's Lynn, United Kingdom) as previously described

(Duby and Matagne 1999). The cytochrome pathway and the alternative pathway of respiration were inhibited by addition of 1-mM potassium cyanide in aqueous solution and 1-mM salicylhydroxamic acid (SHAM) in ethanol (final concentration 1%), respectively. The possible inhibitory effect of ethanol alone was subtracted from the measurements. The apparent capacity of each pathway corresponds to the following respiratory rates: For the cytochrome pathway, the oxygen consumption inhibited by KCN after addition of SHAM; for the alternative pathway, the oxygen consumption inhibited by SHAM after addition of KCN.

In Silico Analyses

Multiple-sequence alignments of polypeptides were performed with MUSCLE program available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html> (Edgar 2004). The tree shown in figure 2 was conservatively assembled from recent phylogenetic studies of the green lineage (Lewis and McCourt 2004; Müller et al. 2004; Pombert et al. 2004, 2005; Rodriguez-Espeleta et al. 2007). Gene gain and losses for mitochondrial ATP synthase subunits were then mapped onto the tree from presence-absence data derived from table 1 using unweighted Dollo parsimony as implemented in DOLMOVE (PHYLP package; Felsenstein J. 2005. PHYLP [phylogeny inference package] version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA). As DOLMOVE cannot handle polytomies, nine variants of the tree were successively considered to account for uncertain relationships within Chlorophyceae and among classes of Chlorophytes, though yielding highly similar mapping. Basic alignment search tool (Blast) searches (Altschul et al. 1997) were carried out on the NCBI portal (Johnson et al. 2008) using sensitive parameters (e.g. BLOSUM45 matrix, smaller word size, and masking of low complexity regions for look-up only). Both PSI-BlastP/BlastX searches against the nonredundant protein (nr) database and TblastN/TblastX searches against non human/nonmouse expressed sequence tags (ESTs) (est_others) were conducted.

Transmission Electron Microscopy

Chlamydomonas reinhardtii cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) for 2 h at 4 °C and washed three times with PBS by centrifugation in a table-top centrifuge. The algal cells were post-fixed with 1% osmium tetroxide. Dehydration was carried out at room temperature in a graded series of ethanol at a concentration from 40% to 100% (v/v) in 10% increments. Then, samples were placed two times for 15 min each in propylene oxide. Pre-embedding in 1:1 propylene oxide-epoxy resin was conducted overnight. Thin sections (50–60 nm thick) were cut with an ultramicrotome (Leica Ultracut R) and placed onto formvar-coated copper grids. Grids were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a JEOL 1200 EX II transmission electron microscope operating at 60 or 70 kV.

Mass Spectrometry Analyses

Coomassie blue-stained proteins associated with spots or bands of interest were manually excised. Gels plugs were

Table 1. Subunit Composition of Mitochondrial F₁F₀-ATP Synthase in Eukaryotes.

Name Subunit	Streptophyta								Chlorophyta									
	Metazoa B.t.	Fungi S.c.	Rodophyta C.m.	Taucheophyta A.t.	Marchantiophyta Ma.p.	Bryophyta P.p.	Charophyceae C.v.	Prasinophyceae O.z.	Trebouxiophyceae P.w.	Ulvophyceae P.a.	U.l.	Chlorophyceae S.o. C.e. C.r. V.c.						
<i>α</i> (ATP1)	nu	nu	nu	mt	mt	mt	mt	mt	nu	mt				+	nu	nu		
<i>β</i> (ATP2)	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu				+	nu	nu	
<i>γ</i> (ATP3)	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu					nu	nu	
<i>δ</i> (ATP16)	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu					nu	nu	
<i>ε</i> (ATP15)	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu					nu	nu	
OSCP (ATP5)	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu					+	nu	nu
A6L (ATP8)	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt								
F6	nu	nu	—	—	—	—	—	—	—	—								
IF ₁	nu	nu	—	nu	nu	nu	—	—	—	—								
<i>a</i> (ATP6)	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt								
<i>b</i> (ATP4)	nu	nu	nu	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt								
<i>c</i> (ATP9)	nu	nu	nu	mt	mt	mt	mt	nu	mt	mt								
<i>d</i>	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu								
<i>e</i>	nu	nu	—	—	—	—	—	—	—	—								
<i>f</i>	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu								
<i>g</i>	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu								
A _{ss4} /F _{sd} (ATP7)	—	—	—	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu								
A _{ss1}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
A _{ss2}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
A _{ss3}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
A _{ss5}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
A _{ss6}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
A _{ss7}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
A _{ss8}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
A _{ss9}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—								
scf1	—	nu	—	—	—	—	—	—	—	—								
Scf2	—	nu	—	—	—	—	—	—	—	—								
<i>i</i>	—	nu	—	—	—	—	—	—	—	—								
<i>k</i>	—	nu	—	—	—	—	—	—	—	—								
<i>w</i>	nu	—	—	—	—	—	—	—	—	—								

NOTE.—Subunits present in the indicated organisms are marked as (mt) if mitochondria encoded or as (nu) if nuclear encoded. (—), no homolog could be identified in the nuclear or mitochondrial genomes. Blank spaces indicate that we cannot yet decide for the presence or for the absence of a particular subunit due to the lack of biochemical or molecular data. Subunits marked in **italics** are conserved in all mitochondrial F₁F₀-ATP synthases. Subunits marked in **bold** are conserved in all eukaryotes except in Chlorophyceae. Abbreviations: B.t., *Bos taurus*; S.c., *Saccharomyces cerevisiae*; C.m., *Cyanidioscytlus merolae*; A.t., *Arabidopsis thaliana*; Ma.p., *Marchantia polymorpha*; P.p., *Physcomitrella patens*; C.v., *Chlamydomonas reinhardtii*; O.z., *Ostreococcus tauri*; P.w., *Protonotus wickerhamii*; C.e., *Chlorella vulgaris*; P.a., *Pseudonocardium albidum*; U.l., *Ulva lactuca*; S.o., *Scenedesmus obliquus*; C.a., *Chlorococcum dipandium*; C.r., *Chlamydomonas reinhardtii*; V.c., *Volvox carterii*; OSCP, Oligomycin Sensitivity-Conferring Protein. See [supplementary Table 1](#), Supplementary Material online, for accession numbers.

transferred together with 200- μ l high performance liquid chromatography water into 0.5-ml polypropylene Protein LoBind Eppendorf tubes. Water was replaced by 200 μ l 50 mM ammonium carbonate (pH 8.0) in 50% acetonitrile. After incubation for 5 min at 20 °C under shaking, the solution was replaced by 200 μ l 10% acetonitrile. After incubation for 5 min, acetonitrile was removed, and gels plugs were dried under vacuum (Savant Speed Vac Concentrator). Gel plugs were rehydrated in 20 μ l of a digestion buffer containing 50 mM ammonium carbonate (pH 8.0) and 0.5 μ g of trypsin. Proteolysis was performed for 16 h at 37 °C and stopped by adding 10 ml 1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA). Supernatants of each tube were transferred into new tubes. Fifty microliters of peptide extraction solution containing 50% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) TFA were added to the gel plugs. After incubation for 5 min, extracts were combined with the first ones. A second extraction with 50 μ l of 100% acetonitrile was performed, and after 5 min, the extract was combined with the previous two ones and dried under vacuum (Savant Speed Vac Concentrator). Peptides were solubilized in 20 μ l 0.1% TFA, desalted, and concentrated using a C18 ZipTip (Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer protocol. Two microliters of 10 mg ml⁻¹ of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (alpha-cyano matrix-assisted laser desorption/ionization [MALDI] matrix) in 50% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) TFA were mixed with 2 μ l of each ZipTip concentrated peptide solution. From this, 0.5 μ l was layered on an Opti-TOF 384 Well Insert MALDI plate (Applied Biosystems). MS and MS/MS spectra were acquired using an Applied Biosystems 4800 MALDI time of flight (TOF/TOF) Analyzer spectrometer with a 200-Hz solid-state laser operating at a wavelength of 355 nm. MS spectra were obtained using 3,200 and 2,000 laser shots per spot in a range of *m/z* between 800 and 4000. MS/MS spectra were obtained by selecting the 15 most intense precursor ions per spot and using 3,800 and 2,100 laser shots per precursor. The automatically selected precursors were submitted to a collision energy of 1 kV with collision gas (air) at a pressure of about 1×10^{-6} Torr. Data were collected with the Applied Biosystems 4000 Series Explorer software.

MS and MS/MS queries were performed using the Applied Biosystems GPS Explorer 3.6 software together with the Matrix Science Ltd MASCOT Database search engine v2.1 using nonredundant protein (nr) database from NCBI. Precursor tolerance of 150 ppm for MS spectra and 0.1-Da fragment tolerance for MS/MS spectra were allowed. A charge state of +1 was selected. A single trypsin miscleavage and variable modifications consisting of methionine oxidation and acrylamide-modified cysteine were allowed. For protein direct identification with MASCOT, protein scores greater than 68 were considered as significant ($P < 0.05$). The Applied Biosystems GPS Explorer—DeNovo Explorer Version 3.6 software was used for identifying proteins that had not been previously characterized or are not contained in protein databases. MS/MS data were submitted to the DeNovo Explorer software to generate amino acid sequences, using mass differences be-

tween peaks. The obtained sequences were manually verified and submitted to UniProt database using the FASTS program (EMBL-EBI). Proteins matching two or more peptides were taken into consideration.

Results

Within Plantae, the Presence of Asa Subunits Is Limited to Chlorophycean Algae

To obtain evidence of the presence of Asa subunits in chlorophycean species that do not belong to the order of Chlamydomonadales, we first analyzed a crude membrane preparation of *C. ellipsoideum* cells (order of Chlorococcales). Membrane proteins solubilized by addition of *n*-dodecyl-maltoside or Triton X-100 were separated by BN-PAGE. This technique allows the separation of mitochondrial complexes in their native form (Schägger and Von Jagow 1991). A subsequent in-gel detection of ATPase activity (leading to a white calcium phosphate precipitate) indicated that complex V from *C. ellipsoideum* migrates at approximately 1,700 kDa (fig. 1a). This observation is consistent with previous works in which it was shown that complex V from *C. ellipsoideum*, *C. reinhardtii* and other chlorophyceans species exhibits the same electrophoretic mobility (~1,600–1,700 kDa) and migrates under dimeric form (V_2) (Vázquez-Acevedo et al. 2006; Villavicencio-Quejido et al. 2009). An additional band bearing ATPase activity could be visualized at about 300 kDa. It might correspond to either a mitochondrial or a chloroplastic F_1 moiety. The band corresponding to the dimeric complex V was excised from the BN gel and its constitutive subunits were then separated by denaturing SDS-PAGE. A minimum of 10 bands of molecular mass ranging from 65 to 8 kDa were observed after Coomassie blue staining (fig. 1a, lane 4). Mass spectrometry analysis (MS combined with MS/MS MALDI TOF/TOF) allowed the identification of bands 2, 3, 5, and 6 as mitochondrial subunits β (ATP2), α (ATP1), *a* (ATP6), and oligomycin sensitivity-conferring protein (oligomycin sensitivity-conferring protein [OSCP], ATP5), respectively. Although peptide MS/MS spectra were obtained for the other bands, they did not match any known ATP synthase subunits. De novo sequencing from the MS/MS spectra was then undertaken, and this allowed us to identify bands 1 and 4 as homologs to atypical subunits Asa1 and Asa2 of *C. reinhardtii* (fig. 1b).

We undertook the same approach with *S. obliquus* (Sphaeropleales order) and found that complex V behaves as a 1,600-kDa dimer in BN-PAGE (data not shown), as previously observed (Vázquez-Acevedo et al. 2006). We however failed to obtain enough material to perform SDS-PAGE and subsequent MS analysis. As an alternative approach, we investigated the nucleic sequences available at NCBI for *S. obliquus*. In addition to subunits *a* and *c* encoded in the mitochondrial genome of *S. obliquus*, we identified putative homologous sequences for subunits β , γ , Asa4, Asa5, Asa7, and Asa9 in the EST data set (~6,600 ESTs) (table 1 and supplementary table S1, Supplementary Material online). Altogether, the detection of ASA genes in species belonging to three different chlorophycean

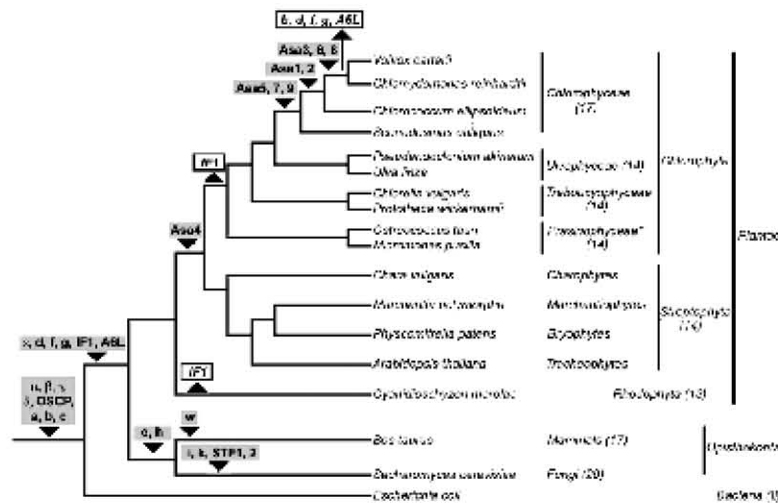


Fig. 2. Phylogenetic distribution of mitochondrial ATP synthase gene gains and losses in the green lineage. Clades and species for which the subunit composition of the mitochondrial ATP synthase has been (at least partially) determined are indicated. Gene gains and losses were mapped onto the tree from presence-absence data derived from [table 1](#) using unweighted Dollo parsimony. Phylogenetic relationships were drawn from other studies (see text). Incoming and outgoing arrows from the tree represent gains and losses, respectively, of the subunits shown in the box. Numbers accompanying species names indicate the presumed number of complex V subunits. *This class may comprise several distinct lineages that warrant class-level ranking (e.g., Lewis and McCourt 2004).

is rather similar to that found in *A. thaliana* (Heazlewood et al. 2003; Cardol et al. 2005) and to that that we could deduce from mining nucleic sequence database (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>) of the red alga *Cyanidioschyzon merolae*.

As to date, *Asa* subunits are still of unknown evolutionary origin (Vázquez-Acevedo et al. 2006; Van Lis et al. 2007), we performed sensitive database searches aiming at identifying potential homologs in other organisms (i.e., all eukaryotes and prokaryotes). For *Asa1*, *Asa5–7*, and *Asa9* subunits, we did not observe any significant hit ($E \leq 10^{-3}$) beyond chlorophytean algae. In contrast, a very significant hit (GD169774; $E = 10^{-32}$) was obtained for *Asa8* with an EST from the ciliate *Sterkiella (Oxytricha) histriomuscarum*. When using this EST as the query of a reciprocal TBLASTX search, the best match was with an EST (DV203963; $E = 10^{-36}$) from *Haematococcus pluvialis* (Chlamydomonadales), while an additional *Sterkiella* EST (GD170269; $E = 10^{-25}$) was also identified. Because these searches did not yield any nonchlorophytean organism other than this ciliate, which is known to prey on algae, we interpret these two ESTs as probable Chlamydomonadales contaminations of *Sterkiella* libraries. In the cases of *Asa2* and *Asa3*, a few weak hits ($E > 10^{-11}$) were observed with a flavo-protein monooxygenase found in Prasinophyceae (e.g., CAL55851) as well as with a series of oxygenase-related ESTs from Dinophyceae (e.g., *Karenia brevis*, *Karlodinium micrum*, and *Alexandrium catenella*). Further examination of these results suggests that these matches are likely spu-

rious as 1) both *ASA2* and *ASA3* proteins lack an oxygenase domain and 2) most of these hits disappear when enabling the low complexity filter of the Blast engine.

In a next step, we inferred gene gains and losses for mitochondrial ATP synthase subunits using Dollo parsimony. To this end, we conservatively assembled an evolutionary tree featuring relationships drawn from previous phylogenetic studies (Müller et al. 2004; Pombert et al. 2004; Keeling et al. 2005; Rodríguez-Ezpeleta et al. 2007). In Chlorophyta, aside from the well-accepted basal position of Prasinophyceae, the relative branching order of Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, and Ulvophyceae is still a matter of debate, which led us to consider three different subtrees (Pombert et al. 2004, 2005; Rodríguez-Ezpeleta et al. 2007). Similarly, unresolved relationships within Chlorophyceae (e.g., Lewis and McCourt 2004) entail three variants of each subtree, thus amounting to nine possible evolutionary scenarios. Whatever the scenario examined, however, highly similar gene gains and losses were obtained (data not shown); hence, we present only the most consensual scenario in [figure 2](#). Using *E. coli* as the bacterial representative, 8 subunits ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, a, b, c$, and OSCP) are shared between Bacteria and eukaryotes, whereas 6 subunits ($\epsilon, \delta, f, g, IF_1, A6L$) were acquired deeply in the eukaryotic tree. Opisthokonta later acquired subunits *e* and *h*, and a few additional subunits were further acquired either by Fungi or along the lineage leading to mammals. In Plantae (represented here by the green lineage and the rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*), all organisms appear to share a similar set of subunits, to the notable exceptions of *IF_1*, which has been lost

independently twice, and of chlorophycean subunits. In the latter class, indeed, five classical subunits disappeared (*b*, *d*, *f*, *g*, and *A6L*), whereas eight new subunits (*Asa*) were recruited.

Altogether, our observations thus strengthen the proposal that atypical *Asa* subunits might be component characteristic of the mitochondrial ATP synthase of Chlorophyceae.

Loss of *Asa7* Atypical Subunit in *C. reinhardtii* Leads to an Unstable Complex V

In a next step, we decided to initiate the study of *Asa* subunit function in Chlorophyceae. In *C. reinhardtii*, efficient targeted gene disruption by homologous recombination is not yet available for nuclear genes. However, interference with the expression of specific genes by dsRNA (RNAi) is a powerful method to investigate protein function in this organism (Schroda 2006; Molnar et al. 2009). To suppress the expression of *ASA7* gene, a gene sequence also identified in *S. obliquus*, a strain of *C. reinhardtii* lacking the cell wall and auxotrophic for arginine was cotransformed with the plasmid pASL (bearing the *ARG7* gene as a selectable marker) and the plasmid designed for RNAi (p*ASA7*-RNAi) (see Materials and Methods section). Among 100 Arg^+ prototrophic transformants selected on TAP agar plates in the light, 40 had integrated the RNAi construction, as found by PCR experiments (data not shown). Levels of *ASA7* transcript and *ATP2* (encoding ATP synthase β subunit) transcripts taken as a control were estimated by RNA blotting. *ASA7:ATP2* transcript ratio was strongly diminished in transformants T17 (fig. 3a) and T30 (data not shown). To check the amount of *Asa7* protein in T17 mutant comparatively to wild-type, crude membrane extracts were analyzed by immunoblotting using polyclonal antibodies raised against *C. reinhardtii Asa7* and *Polytomella* sp. *Pringsheim* 198.80 $\beta/\text{Atp2}$ subunits. Although a strong signal was obtained with *Asa7* antibodies for the wild type, no signal was detected in transformant T17 (hereafter referred as *ASA7-silenced* strain) (fig. 3b). Conversely, no significant difference between the two strains could be detected when using the antibodies against β subunit.

To determine the assembly state and the ATPase activity of complex V in *ASA7-silenced* strain, respiratory-chain complexes from purified mitochondria were solubilized with *n*-dodecyl-maltoside and further separated by BN-PAGE. Both in-gel ATPase activity assay (fig. 3c) and Coomassie blue staining (fig. 3d) revealed that in wild-type control extracts, F_1F_0 -ATP synthase is present at 1,700 kDa (dimeric form) and exhibits ATPase activity. In contrast, ATPase activity is almost exclusively observed as one or two bands of ~400 kDa in *ASA7-silenced* when mitochondria are solubilized by 10% *n*-dodecyl-maltoside. Surprisingly, solubilization with 40% *n*-dodecyl-maltoside led to a moderate signal for the dimer and to the occurrence of an additional ATPase band of intermediary molecular mass (about 520 kDa). Similar observations could be made with other nonionic detergents (digitonin and Triton X-100, data not shown).

The subunit composition of wild-type dimeric complex V and mutant 400-kDa ATPase was determined by further

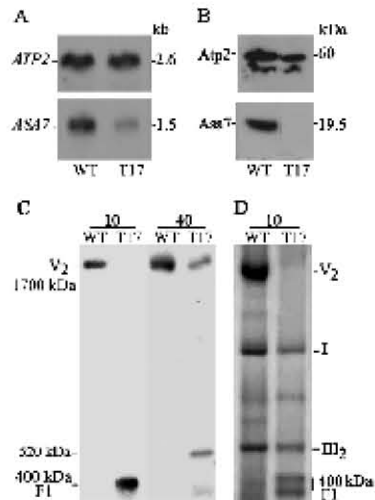


FIG. 3. Analysis of *ASA7* and *ATP2* gene transcripts and corresponding protein amounts and study of ATP synthase dimer stability in wild-type (WT) and *ASA7*-silenced transformant T17. (A) RNA blot analysis. Hybridization patterns were obtained with *ATP2* and *ASA7* probes on RNA (15- μg) blots from WT and *ASA7*-silenced transformant T17. (B) Western blot analysis. Proteins from WT and *ASA7*-silenced transformant T17 crude membrane fractions (15 μg per lane) were resolved by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes and immunoblotted with the indicated antibodies (from top to bottom: anti-Atp2 and anti-Asa7 from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Polytomella* sp. *Pringsheim* 198.80, respectively). In the case of Atp2, only the upper band corresponds to mitochondrial ATP synthase β subunit from purified complex V (Lapaille M, Remacle C, Cardol P, unpublished results). (C,D) BN-PAGE analysis. Purified mitochondria (50 μg of protein) of *C. reinhardtii* WT and *ASA7*-silenced transformant T17 (T17) strains were loaded onto a BN gel after solubilization with 10% or 40% (w/w) of *n*-dodecyl- β -D-maltoside as indicated on top of the lanes. After electrophoresis, the gel was stained for ATPase activity (C) or with Coomassie blue (D). V₂, dimeric complex V; I, Complex I; III₂, dimeric complex III; and F₁, F₁ moiety of complex V.

analyzing the corresponding bands by SDS-PAGE experiments (fig. 4). It is to be noted that the 520-kDa ATPase band (fig. 3c) is almost undetectable in Coomassie blue-stained gel (data not shown). For this reason, it was not analyzed in more detail. From the wild-type dimeric enzyme, we resolved 11 bands. Their subsequent analysis by MS identified 15 of the 17 subunits belonging to the *C. reinhardtii* enzyme (Vázquez-Acevedo et al. 2006; Van Lis et al. 2007) (fig. 4a and supplementary table S2, Supplementary Material online). Only the small ϵ subunit and the 60-kDa *Asa1* protein were missing in our analysis. From the 400-kDa doublet investigated as a unique band, three spots were resolved and unambiguously identified by MS as α , β , and γ subunits of the mitochondrial ATP synthase F₁ moiety (fig. 3b and supplementary table S2, Supplementary Material online). Based on the predicted molecular mass of individual proteins (Vázquez-Acevedo

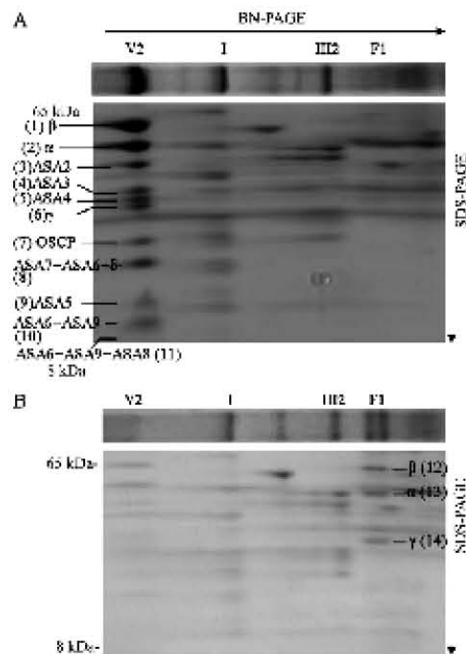


FIG. 4. Two-dimensional BN/SDS-PAGE analysis of *Chlamydomonas* wild-type (A) and *ASA7*-silenced mutant (B) mitochondria. Whole lanes from BN-PAGE (see [fig. 2D](#)) were loaded on a Tricine-SDS gel (10% acrylamide) for subsequent resolution of the protein complexes into their respective components. The main respiratory-chain complexes are indicated in the first dimension (BN-PAGE, see legend of [figure 3](#) for details). Gels were stained with Coomassie blue. Numbers refer to [supplementary table 2](#), [Supplementary Material](#) online.

et al. 2006), the theoretical molecular mass of the F_1 fraction ($\alpha_2\beta_3\gamma\delta\epsilon$) was deduced to be 406.6 kDa, a value fitting very well with the estimated mass of the ATPase subcomplex found in the *ASA7*-silenced mutant ([fig. 3](#)) and also with the 400 kDa apparent molecular mass of the F_1 fraction obtained after heat-treatment dissociation of *Polytomella* sp. *Pringsheim* 19880 complex V (Vázquez-Acevedo et al. 2006; Van Lis et al. 2007). In this respect, the 520-kDa ATPase band shown in [figure 3](#) should correspond to the F_1 moiety associated with few other proteins. Taking into account that a small amount of the fully assembled enzyme could be observed in *ASA7*-silenced strain ([figure 3c](#)), one can hypothesize that *Asa7* is involved in the stability of the dimeric F_1F_0 mitochondrial ATP synthase.

To analyze the possible phenotypical consequences of *Asa7* loss, we compared the growth of the *ASA7*-silenced mutant and wild-type strains cultivated in the light (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or in the dark on agar medium containing acetate (5 mM) as an exogenous carbon source. Consequences of *Asa7* loss on cell fitness and bioenergetics were then investigated. The photoauto, auxo, or mixotro-

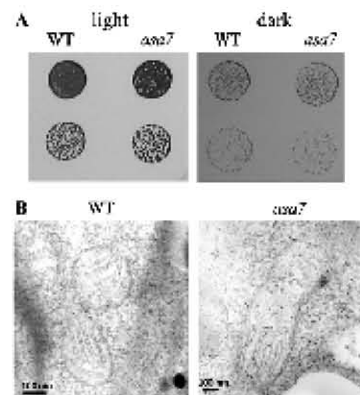


FIG. 5. Growth phenotype and mitochondrial structure of wild-type and *ASA7*-silenced mutant cells. Cells were cultivated in mixotrophic (light, 5 mM acetate) or heterotrophic (dark, 5 mM acetate) conditions. (A) Cell suspension were spotted at two different cell densities (upper line, $A_{750} = 0.05$; bottom line, $A_{750} = 0.005$) on solid agar plates, and growth was evaluated after 3 days in the light and 10 days in the dark. (B) Electron microscopy analysis showing the mitochondrial ultrastructure from mixotrophically grown cells. Bar, 100 nm.

phic growth of wild-type control and *asa7* mutant cells was then compared on agar plates. A marked phenotype was expected, especially in auxotrophic conditions where energy production, mainly relying on the sole mitochondria of *Chlamydomonas*, should be deeply affected by the ATPase activity of free F_1 moieties. As shown in [fig. 5a](#), the *ASA7*-silenced strain behaved exactly as the control strain under both conditions. Additional combinations of light intensities (0, 5, 50, or 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), acetate concentrations (0, 5, or 17 mM) and temperatures (16, 25, or 34 °C) were explored, but no abnormal phenotype could be observed for the mutant (data not shown). In the yeast *S. cerevisiae*, subunits *e*, *g*, and *k* are those involved in complex V dimerization (Arnold et al. 1998). Although exhibiting a normal growth phenotype, yeast mutants altered in subunits *e* or *g* exhibit abnormal mitochondrial structures, probably related to the absence of oligomeric ATP synthases (Arselin et al. 2004). To evaluate the impact of *Asa7* loss on mitochondrial structure in *C. reinhardtii*, we investigated mitochondria morphology by electron microscopy. Mitochondria size, shape, and cristae were quite similar in both genotypes ([Fig. 5B](#)). These observations suggest that in vivo, the dimeric state of complex V in *C. reinhardtii* is not affected by the loss of *Asa7* subunit.

Higher Sensitivity to Oligomycin in *C. reinhardtii* Lacking Subunit *Asa7*

As a next step, we investigated the effect of two respiratory inhibitors: myxothiazol, which inhibits the cytochrome *bc*₁ complex activity, and reduces the H^+ gradient formation (Von Jagow and Link 1986), and oligomycin, which

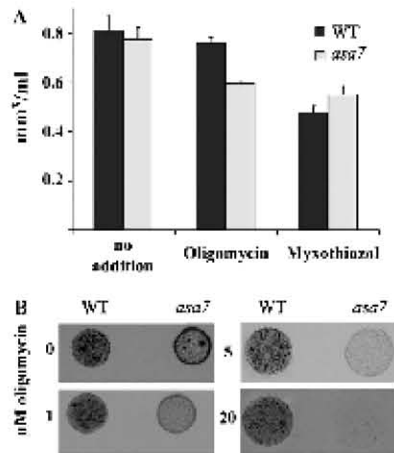


Fig. 6. Impact of inhibitors of the mitochondrial respiratory chain on growth of WT and ASA7-silenced cells. (A) Biomass accumulated after 24 h (starting concentration: $0.2 \text{ mm}^3 \text{ ml}^{-1}$) under mixotrophic conditions in the absence or presence of the mitochondrial respiratory inhibitor oligomycin ($5 \mu\text{M}$) or myxothiazol ($5 \mu\text{M}$). Biomass was calculated as the product of the cell density (cell/ml) by the mean cell volume (mm^3). Error bars indicate standard deviation of the mean from three independent measurements. (B) Cells were cultivated in heterotrophic conditions (dark, 5 mM acetate) in the absence or presence of oligomycin (1, 5, or $20 \mu\text{M}$). Cell suspensions ($A_{750} = 0.1$) were spotted on solid agar plates, and growth was evaluated after 10 days in the dark.

prevents H^+ channeling through the F_0 moiety of mitochondrial ATP synthase, with no or only a weak effect on chloroplast photophosphorylation (reviewed in Hong and Pedersen 2008). During the exponential growth phase under standard conditions ($50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 5 mM acetate, 25°C), the cell doubling time was similar for the wild-type control ($11.9 \pm 0.9 \text{ h}$) and the ASA7-silenced mutant ($12.5 \pm 0.8 \text{ h}$). In the presence of myxothiazol, inhibition of cell growth was similar in control and mutant strains (fig. 6A), and its magnitude was in good agreement with previous reports in *C. reinhardtii* (e.g. Cardol et al. 2002). Surprisingly, wild-type cells were rather insensitive to the presence of oligomycin. In contrast, a significant sensitivity to oligomycin was observed for ASA7-silenced mutant cells. The same effect could be observed for cells grown heterotrophically on solid medium supplemented with 1, 5, or $20 \mu\text{M}$ oligomycin (fig. 6B). Wild-type cells were almost insensitive to oligomycin, whereas ASA7-silenced mutant growth was gradually inhibited as the oligomycin concentration increased.

To evaluate the possible impact of Asa7 loss on mitochondrial respiratory activity, oxygen uptake of ASA7-silenced cells in the dark was compared with control cells. The results presented in table 2 show that the total respiration rate was slightly weaker in ASA7-silenced cells (80% of WT). Myxothiazol and SHAM were used to inhibit the cytochrome pathway and the alternative oxidase pathway of respiration, respec-

Table 2. Dark Respiratory Rate and Steady-State ATP Levels in Wild-Type and ASA7-Silenced Mutant Cells.

	WT	ASA7-Silenced
Respiration $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg chl}^{-1}$		
No addition	45 ± 3	37 ± 4
+ Myxothiazol ($5 \mu\text{M}$)	15 ± 4	18 ± 3
+ SHAM (1 mM)	45 ± 1	36 ± 6
+ Myxothiazol ($5 \mu\text{M}$)	2 ± 2	3 ± 2
+ SHAM (1 mM)		
+ CCCP ($10 \mu\text{M}$)	46 ± 2	48 ± 4
+ Oligomycin ($10 \mu\text{M}$)	46 ± 4	23 ± 3
+ SHAM (1 mM)		
ATP level nmol ATP $\cdot \text{mg chl}^{-1}$		
No addition	73 ± 2	77 ± 5
+ Myxothiazol ($5 \mu\text{M}$)	28 ± 4	23 ± 5
+ Oligomycin ($10 \mu\text{M}$)	78 ± 3	57 ± 5

tively. From the data of table 2, the apparent cytochrome pathway capacities of wild-type and ASA7-silenced cells (expressed in $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg chlorophyll}^{-1}$ and calculated as described in the Materials and Methods section) were 43 ± 3 and 33 ± 4 , respectively, whereas the apparent alternative pathway capacities were 13 ± 3 and 15 ± 3 , respectively. Addition of an uncoupler ($10\text{-}\mu\text{M}$ CCCP) had no effect on wild-type respiration but accelerated the respiration rate of ASA7-silenced cells up to values similar to those of the control. These results suggest that the decrease in cytochrome pathway activity in ASA7-silenced mitochondria could be due to a slight limitation in ATP synthase activity. Addition of $10 \mu\text{M}$ oligomycin did not significantly reduce the respiratory rate of wild-type cells, even after 4 h of incubation in the dark. In this case, SHAM (1 mM) was added at the same time as oligomycin to inhibit the alternative oxidase pathway. This one is not under the control of the electrochemical proton gradient, and its activity could mask a decreased cytochrome pathway activity when complex V is inhibited (Peltier and Thibault 1985). In contrast to our observations for wild-type cells, the respiration of ASA7-silenced cells dropped by about 40% in the presence of oligomycin. The steady-state levels of intracellular ATP were also measured. No difference was observed between the two strains. As expected, the addition of myxothiazol dramatically reduced the ATP levels in both strains after 4-h incubation in the dark. In the same conditions, the presence of oligomycin did not affect the ATP level in wild-type cells. In contrast, the steady-state ATP level was reduced by $\sim 30\%$ in ASA7-silenced cells.

From these analyses, we conclude that ATP synthase activity is still efficient in the absence of Asa7 subunit but becomes partially sensitive to oligomycin.

Resistance to Oligomycin Is a Property Shared by Chlorophycean Algae

From the functional data presented above, it appears that the lack of Asa7 atypical subunit leads to a higher sensitivity

Table 3. Oligomycin Sensitivity in Chlorophytes.

		Phototrophic Growth				Heterotrophic Growth				Dark Respiratory Rate	ATP Level
		0	0.2	1	10	0	0.2	1	10	10	10
Chlorophyceae											
Chlorococcales	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>									98%	98%
Chaetophorales	<i>Uronema acuminata</i>									nd	nd
Chlamydomonadales	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>									nd	nd
	<i>Chlamydomonas moewusii</i>					†	†	†	†	nd	nd
	<i>Chlorogonium elongatum</i>									nd	nd
Sphaeropleales	<i>Scenedesmus obliquus</i>									98%	100%
Trebouxiophyceae											
Chlorellales	<i>Chlorella sorokinia</i>		#	#			#	†	†	43%	37%
	<i>Chlorella vulgaris</i>			#	#		#	†	†	40%	65%
	<i>Nannochloris</i> sp.		#	#	†		†	†	†	nd	nd
Coccomyzales	<i>Coccomyxa pringheimii</i>	#	#	†		†	†	†	†	nd	nd
Ctenocladales	<i>Leptospira obovata</i>		#	#		†	†	†	†	nd	nd
Ulvoiphyceae											
Ulvales	<i>Pseudoclonium basilense</i>		#	#		†	†	†	†	nd	nd
Ulotrichales	<i>Gloeotheopsis paucicellulare</i>		#	#		†	†	†	†	68%	46%
	<i>Ulothrix fimbriata</i>		#	#		†	†	†	†	nd	nd
Prasinophyceae											
Mamiellales	<i>Micromonas pusilla</i>	#	#	#		nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chlorodendriales	<i>Tetraelmis chuii</i>	#	#	#		nd	nd	nd	nd	39%	44%

Notes.—Phototrophic and heterotrophic growths were tested on agar plates supplemented (see fig. 7 for details) with the indicated oligomycin concentrations. White box, no growth daily compared with control plate; #, growth inhibition was observed; and †, no growth. Percentages of residual dark respiratory rate and steady-state ATP levels after 1 h in the dark in the presence of 10 μ M oligomycin and 1 mM SHAM, nd, not determined.

to oligomycin. To determine whether the presence of an atypical or classical ATP synthase in Chlorophytes is correlated to an in vivo resistance or sensitivity to oligomycin, species belonging to various orders of the four classes were selected (see table 3) and tested for their ability to grow under phototrophic and/or heterotrophic conditions on agar plates supplemented or not with 0.2, 1, or 10 μ M oligomycin. As exemplified in figure 7, phototrophic growth of *C. ellipsoideum* cells was insensitive to 10 μ M oligomycin. Conversely, *C. vulgaris*, *G. paucicellulare*, and *T. chuii* grew much slower in the presence of 10 μ M oligomycin. Table 3 summarizes our observations for each species. Without any exception, chlorophyte algae were all insensitive to oligomycin at the concentrations tested, whereas the algae belonging to the other three classes showed a growth reduction already detected for concentrations of 0.2 or 1 μ M oligomycin.

Finally, we evaluated the effect of oligomycin (10- μ M) and SHAM (1-mM) addition on the dark respiratory rate of light-adapted cultures for some species representative of the four algal classes. We also determined the steady-state ATP levels after incubation for 1 h in the dark in the presence or in the absence of oligomycin. Values presented in table 3 indicate that, as previously observed for *C. reinhardtii* wild-type cells (table 2), both parameters were unaffected by oligomycin addition in the two chlorophyte algae *S. obliquus* and *C. ellipsoideum*. In contrast, oligomycin markedly reduced dark respiratory rate and ATP steady-state level in Trebouxiophyceae *Chlorella* species, in the Ulvoiphyceae *G. paucicellulare*, and in the Prasinophyceae *T. chuii*. Altogether these results indicate a strong in vivo resistance of Chlorophyceae to oligomycin.

Discussion

In this work, we gathered and obtained sequence data confirming that core subunits of the bacterial ATP synthase are highly conserved in most eukaryotes. These core proteins are subunits α , β , γ , and δ , of the catalytic sector F_1 , subunits a and c of the H^+ translocation membrane sector F_0 , as well as subunits b and OSCP of the peripheral stator stalk (e.g., Velours and Arselin 2000). In Plantae and Opisthokonts (i.e., Fungi and Metazoa), the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase (complex V) comprises at least 14 conserved subunits, among which six subunits (e , d , f , g , IF_1 , and $A6L$) must have been recruited before the divergence of these two eukaryotic super-groups. Opisthokonts acquired the subunits e and h and a few additional subunits were further acquired either by Fungi or along the lineage leading to mammals. In Plantae, apart from Chlorophyceae (see below), all organisms investigated at the genomic level share a rather similar set of subunits. However, due to the lack of biochemical characterization of the enzyme complex in most of these species, we cannot exclude that other species-specific subunits may exist. In contrast, five classical subunits (b , d , f , g , and $A6L$) were not observed in representative of three orders of Chlorophyceae (Chlamydomonadales [Cardol et al. 2005; Vázquez-Acevedo et al. 2006; Van Lis et al. 2007], Chlorococcales, and Sphaeropleales), whereas up to eight Asa subunits of unknown origin were identified. Although molecular data are not yet available for other orders of Chlorophyceae (e.g., Chaetophorales and Oedogoniales), these findings suggest that Asa subunits could be components characteristic of the mitochondrial ATP synthase in the whole chlorophyte lineage.

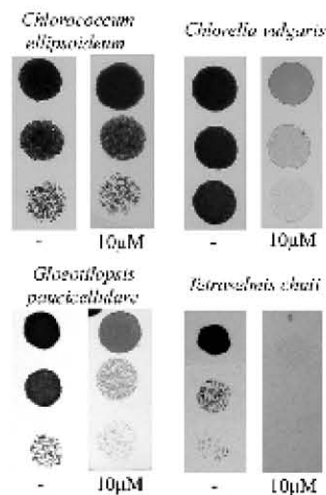


Fig. 7. Oligomycin sensitivity in Chlorophytes. The sensitivity of four chlorophycean algae representative of the four classes of Chlorophytes (see table 3) was tested after 5 days of growth in the light ($50\text{-}\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) on agar plates supplemented or not with $10\text{ }\mu\text{M}$ oligomycin as indicated on the picture. Cells were plated at three different cell densities (from top to bottom, $A_{750} = 0.2, 0.05, \text{ and } 0.01$).

This conclusion is in line of our previous hypothesis (Vázquez-Acevedo et al. 2006) according to which the absence of *atp4* (subunit *b*) and *atp8* (subunit A6L) genes in the mitochondrial genome is a clue pointing to the presence of an atypical enzyme. Both genes are indeed absent from chlorophycean mitochondrial genomes but are found in the mitochondrial genome of nonchlorophycean Chlorophytes and Streptophytes (Vázquez-Acevedo et al. 2006) (see also table 1). Moreover, chlorophycean mitochondrial genomes exhibit a distinct pattern of evolution (Tumel et al. 1999), with an extremely compact and sometimes linear organization, and contain scrambled rRNA genes along to only a few short noncoding regions. Gene transfer from mitochondria to the nucleus also occurred massively, thus leading to relocalization of several genes (e.g., *cox2*, *cox3*, *nad3*, *nad4L*, *nad7*, and *nad9*) coding for core subunits of respiratory-chain complexes that are still mitochondria encoded in other green plants and in the vast majority of eukaryotes (e.g., Bullerwell and Gray 2004; Vázquez-Acevedo et al. 2006). In the cases of *atp4* and *atp8*, no homolog could be found in the nuclear genome of *C. reinhardtii* or *V. carteri* (Cardol et al. 2005; Vázquez-Acevedo et al. 2006). Marx and collaborators suggested that the migration of mitochondrial genes to the nucleus may actually be the underlying cause for the recruitment of additional subunits (Marx et al. 2003). In addition, these authors proposed that the number of genes that have migrated to the nucleus is correlated with the number of secondarily acquired subunits. Two scenarios could be invoked for the origin of *Asa* subunits: 1) the

retargeting of previously plastidic/cytosolic proteins to the mitochondria (possibly after gene duplication), and their assembly into a new scaffold in the peripheral stalk of the ATP synthase, or 2) the acquisition of novel genes by lateral gene transfer (either from bacterial or eukaryotic origin), and the utilization of the corresponding proteins as novel subunits of the ATP synthase. From our database searches, it not possible to conclude as we did not find any homolog (neither ortholog or paralog) for *Asa* genes (except *Asa4*) beyond Chlorophyceae. Thus, whatever their origin, *Asa* subunits are likely to have undergone extensive evolutionary divergence. In Chlorophyceae, the recruitment of *Asa* subunits might be concomitant to the loss of mitochondrial genes for ATP synthase proteins (including subunits *b* and A6L) along with the loss of secondarily acquired subunits *d*, *f*, and *g*. Subunits *b* and *d* are the main building blocks of the peripheral stator architecture in eukaryotes (Velours and Arsélin 2000; Walker and Dickson 2006), whereas subunit *g* is critical for dimer stability (Arnold et al. 1998; Arsélin et al. 2004). In *C. reinhardtii*, lack of *Asa7* leads to a less stable dimeric enzyme that partially dissociates after detergent exposure and BN-PAGE, hence releasing the F_1 moiety. This observation provides a consistent proof of the involvement of this atypical subunit in the peripheral stator and/or in the dimerization architecture of the chlorophycean ATP synthase. This is not the first example of a modification of the stator and dimerization module architecture during species evolution. Indeed, contrarily to F_1 and F_0 subunit composition, the composition of the peripheral stator differs between bacterial and classical mitochondrial enzymes (reviewed in Walker and Dickson 2006): formed by OSCP (named δ in prokaryotes) and by an homodimer or heterodimer of subunit *b/b'* in prokaryotes, the peripheral stator contains four main subunits in Metazoa and Fungi (subunits *b*, *d*, *h*, and OSCP) (Walker and Dickson 2006).

In the yeast *S. cerevisiae*, mutations in the stator also have no effect on F_1 assembly but do affect its ability to interact with the F_0 part in vivo (reviewed in Rak et al. 2009). This in vivo effect is not observed in the *ASA7-silenced* mutant, because ATP synthase activity (and presumably complex V assembly) in the mutant is barely affected. The number of subunits known to be involved in the dimerization process also differs from one group to another: three in yeast (*e*, *g*, and *k*), two in mammals (*e* and *g*), and one in plants (*g*). In contrast to the stator, the dimerization module is dispensable for cell survival (Arnold et al. 1998). Functional roles of ATP synthase oligomers have been, however, suggested and were recently reviewed (Wittig and Schagger 2009). Briefly, they include dynamic regulation of ATP synthase activity, stabilization of the holoenzyme, bending of membranes to alter the local pH gradient, and participation in supramolecular arrangement of respiratory complexes. In this respect, unlike other known ATP synthases, dimeric mitochondrial complex V of chlorophycean algae hardly dissociates upon solubilization with nonionic detergents, whereas a dimeric enzyme in nonchlorophycean Chlorophytes, if present, still remains to be identified (Van Lis et al. 2003, 2007;

Vázquez-Acevedo et al. 2006). This strongly indicates that the stability of dimeric complex V as judged from BN-PAGE experiments could be taken as an indicator of the enzyme subunit composition. In green algae at least, a highly stable dimeric enzyme would be correlated with an atypical subunit composition, whereas an unstable dimeric enzyme would reflect a classical subunit composition. In *C. reinhardtii* and *Polytomella* sp. *Pringsheim* 198.80, monomeric F_1F_0 or free F_1 moieties were observed only after heat treatment or addition of biliary salts, the monomeric form exhibiting a very short half-life time (~ 1 min) in these conditions (Van Lis et al. 2007; Villavicencio-Queijeiro et al. 2009). The dimeric organization of the mitochondrial ATP synthase from *C. reinhardtii* is also unaffected by the cellular metabolic state, in contrast with the chloroplastic dimeric complex V (Rexroth et al. 2003; Schwassmann et al. 2007). Lack of Asa7 does not seem to alter mitochondrial structure, cell growth, or ATP level. It is thus tempting to conclude that in vivo, the dimeric state prevails in the absence of Asa7 and that other Asa subunits might be involved in dimer stability. Asa6 could be instrumental in maintaining the dimeric synthase conformation as suggested by the presence of a possible coiled coil (Van Lis et al. 2007) and evidenced by cross-linking experiments in *Polytomella* sp. *Pringsheim* 198.80 (Villavicencio-Queijeiro et al. 2009). However, it is important to remember that Asa6 and Asa7 subunits do not share any similarity with classical subunits *e*, *g*, and *k* (Vázquez-Acevedo et al. 2006; Van Lis et al. 2007), which mediate dimerization of the yeast ATP synthase (Arnold et al. 1998; Brunner et al. 2002). In *Polytomella* sp. *Pringsheim* 198.80, dimeric complex V is also more resistant than the monomeric form to heat treatment, high hydrostatic pressure, and protease degradation (Villavicencio-Queijeiro et al. 2009). These results point out possible evolutionary advantages in terms of structural integrity brought by the Asa subunits. Due to this highly stable nature, the dimeric ATP synthase from Chlorophyceae is a good candidate to work with in order to further elucidate the functional role of oligomeric state of ATP synthase in eukaryotes.

As highlighted in this work, atypical Asa7 protein is not essential for mitochondrial F_1F_0 -ATPase complex activity and assembly. Surprisingly, an ASA7-silenced mutant is more sensitive to oligomycin than the wild type. Perhaps even more remarkably, species belonging to four orders of Chlorophyceae (see table 3) are insensitive to oligomycin concentrations that reduce cell growth, respiration, and ATP levels of algae belonging to other Chlorophyte classes (i.e., Trebouxiophyceae, Prasinophyceae, and Ulvophyceae).

Produced in various strains of Streptomyces, oligomycins are potent and classical inhibitors of mitochondrial ATP synthase H^+ channel in vitro and also in vivo in various organisms (reviewed in Hong and Pedersen 2008). Two distinct mechanisms for oligomycin resistance, a direct and an indirect one, have been so far described in the yeast *S. cerevisiae*. The direct mechanism involves mutated residues in subunits *a* and *c* (John and Nagley 1986; Nagley et al. 1986). These amino acids are conserved in Chlorophyceae (*C. reinhardtii* and *S. obliquus*), as they are in other green

algae (supplementary fig. 2, Supplementary Material online). In addition, expression of *C. reinhardtii* subunit *a* in an ATP6-deficient human cell line has been claimed to restore oligomycin-sensitive ATP synthesis in permeabilized cells (Ojaimi et al. 2002). At last, the activity of purified complex V from *Polytomella* sp. *Pringsheim* 198.80 is fully inhibited by oligomycin once it is detergent-activated (Villavicencio-Queijeiro et al. 2009). Altogether, these data strongly indicate that the oligomycin binding site is well conserved in the chlorophycean complex V. The indirect mechanism described in yeast requires overexpression of YOR1 protein, an ABC transporter located in the plasma membrane and responsible for multidrug resistance (e.g., Katzmann et al. 1995; Grigoras et al. 2008). Although a hypothetical YOR1 homolog was identified in *Chlamydomonas* (XP_001693422), overexpression of such a plasma membrane transporter would not explain the previous report by Eriksson and coworkers in 1995, who showed that ADP-stimulated respiration of *Chlamydomonas* purified mitochondria is almost insensitive to oligomycin concentrations (up to $1 \mu M$) that fully inhibit the same parameter in isolated pea mitochondria (Eriksson et al. 1995). These authors already suggested that low sensitivity to oligomycin might be related to different properties of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas* as compared with higher plants. The sensitivity to oligomycin of Asa7-deprived cells demonstrates the link between oligomycin resistance in vivo and the presence of atypical complex V subunit composition in Chlorophyceae. Asa7 protein would be positioned in a manner that limits or prevents the access of oligomycin to its action site when the dimeric enzyme is embedded within the inner mitochondrial membrane. This proposal is in good agreement with a working model proposed for the *Polytomella* enzyme (Van Lis et al. 2007), in which Asa7 would be located in the dimerization region in the vicinity of the subunit *a*, which is involved in H^+ channeling and oligomycin sensitivity (see above).

In conclusion, the drastic modification in subunit composition of the peripheral stator and dimerization module that occurred through the recruitment of Asa7 along with other Asa subunits probably conferred on the chlorophycean ancestor new properties in terms of oligomer stability and shielding the H^+ channel against inhibitory molecules. Future work will determine whether other roles might be ascribed to the other Asa subunits. In other respects, we propose that four criteria could be independently taken into consideration to detect an atypical ATP synthase in Chlorophyceae 1) an in vivo resistance to oligomycin, 2) the in vitro stability of the dimeric form of the enzyme, 3) the presence of atypical subunits, or 4) the absence of ATP4 mitochondrial gene coding for subunit *b*.

Supplementary Material

Supplementary figures 1 and 2 and supplementary tables S1 and S2 are available at *Molecular Biology and Evolution* online (<http://www.mbe.oxfordjournals.org/>).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Belgian Fonds pour la Recherche Scientifique (F.R.S.-FNRS 1.C.057.09 and F.4735.06 to P.C., 2.4638.05 and 1.5.255.08 to C.R. as well as 2.4601.08 to M.B. and C.R.), from Action de la Recherche Concertée ARC07/12-04 to C.R., and from the Interuniversity Attraction Poles Program, Belgian Science Policy to M.B. We also acknowledge funding from grants 56619 from CONACYT and IN217108 from PAPIIT, DGAPA, UNAM (Mexico). The authors warmly thank René Matagne for careful reading of the manuscript and also thank Michèle Radoux and Miriam Vázquez-Acevedo for technical assistance. M.L. is supported by the F.R.S.-FNRS. P.C. is F.R.S.-FNRS research associate. E.R.-S. receives a fellowship from CONACYT (203465).

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H. 1998. Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J.* 17:7170–7178.
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J. 2004. The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem.* 279:40392–40399.
- Boyer PD. 2000. Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *Biochim Biophys Acta.* 1458:252–262.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254.
- Brunner S, Everard-Gibst V, Stuart RA. 2002. Su e of the yeast F₁F₀-ATP synthase forms homodimers. *J Biol Chem.* 277:48484–48489.
- Bullenwell CE, Gray MW. 2004. Evolution of the mitochondrial genome protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol.* 7:528–534.
- Cardol P, González-Halphen D, Reyes-Prieto A, Bustin D, Matagne RF, Remacle C. 2005. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol.* 137:447–459.
- Cardol P, Lapaillie M, Minet P, Matagne RF, Franck F, Remacle C. 2006. ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus-encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for the activity and assembly of the enzyme. *Eukaryot Cell.* 5:1460–1467.
- Cardol P, Matagne RF, Remacle C. 2002. Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J Mol Biol.* 319:1211–1221.
- Cardol P, Vanrobaeys F, Devreese B, Van Beeumen J, Matagne R, Remacle C. 2004. Higher plant-like subunit composition of the mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.* 1658:212–224.
- Debuchy R, Purton S, Rochaix JD. 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *Embo J.* 8:2803–2809.
- Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, et al. (26 co-authors). 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11647–11652.
- Duby F, Matagne RF. 1999. Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *omb*, *nd4*, and the 3' end of *nd5*. *Plant Cell.* 11:115–125.
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Bodekema EJ, Braun HP. 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* 579:5769–5772.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* 5:113.
- Eriksson M, Gardstrom P, Samuelsson G. 1995. Isolation, purification and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 107:479–483.
- Gans P, Rebeille F. 1990. Control in the dark of the plastoquinone redox state by mitochondrial activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta.* 1015:150–155.
- Grigoras I, Lazard M, Plateau P, Blanquet S. 2008. Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ABC-transporter Yor1p overexpressed in plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1778:68–78.
- Harris EH. 1989. The *Chlamydomonas* sourcebook. San Diego (CA): Academic Press.
- Heazlewood JL, Whelan J, Millar AH. 2003. The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are FO components in the plant F₁F₀ ATP synthase. *FEBS Lett.* 540:201–205.
- Hong S, Pedersen PL. 2008. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72:590–641.
- John UP, Nagley P. 1986. Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 6 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin resistance. *FEBS Lett.* 207:79–83.
- Johnson M, Zaretskaya I, Rayselis Y, Merezukh Y, McGinnis S, Madden TL. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 36:W5–W9.
- Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Galin J, Volklaert G, Moye-Rowley WS. 1995. Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 15:6875–6883.
- Keeling PJ, Burger G, Dumford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, Roger AJ, Gray MW. 2005. The tree of eukaryotes. *Trends Ecol Evol.* 20:670–676.
- Kindle KL. 1990. High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1228–1232.
- Lewis LA, McCourt RM. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot.* 91:1535–1556.
- Marx S, Baumgartner M, Kannan S, Braun HP, Lang BF, Burger G. 2003. Structure of the bc1 complex from *Scenedesmus ecuadoriensis*, a jakobid flagellate with an ancestral mitochondrial genome. *Mol Biol Evol.* 20:145–153.
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, Garcia JL. 2005. Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:12356–12358.
- Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, Weigel D, Baulcombe D. 2009. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*
- Müller T, Rahmann S, Dandekar T, Wolf M. 2004. Accurate and robust phylogeny estimation based on profile distances: a study of the Chlorophyceae (Chlorophyta). *BMC Evol Biol.* 4:20.

- Nagley P, Hall RM, Ooi BG. 1986. Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin or venturicidin resistance. *FEBS Lett* 195:159–163.
- Newman SM, Boynton JE, Gillham NW, Randolph-Anderson BL, Johnson AM, Harris EH. 1990. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics* 126:875–888.
- Ojaimi J, Pan J, Santra S, Snell WJ, Schon EA. 2002. An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit. *Mol Biol Cell* 13:3836–3844.
- Peltier G, Thibault P. 1985. O₂ Uptake in the light in *Chlamydomonas*: evidence for persistent mitochondrial respiration. *Plant Physiol* 79:225–230.
- Pombert JF, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2004. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Pseudodictyonium akinetum* (Ulvoophyceae) highlights distinctive evolutionary trends in the chlorophyta and suggests a sister-group relationship between the Ulvoophyceae and Chlorophyceae. *Mol Biol Evol* 21:922–935.
- Pombert JF, Otis C, Lemieux C, Turmel M. 2005. The chloroplast genome sequence of the green alga *Pseudodictyonium akinetum* (Ulvoophyceae) reveals unusual structural features and new insights into the branching order of chlorophyte lineages. *Mol Biol Evol* 22:1903–1918.
- Rak M, Zeng X, Briere JJ, Tzagoloff A. 2009. Assembly of F₀ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1793:108–116.
- Remacle C, Baurain D, Cardol P, Matagne RF. 2001. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the nd1 coding sequence. *Genetics* 158:1051–1060.
- Remacle C, Cardol P, Coosemans N, Gaisne M, Bonnefoy N. 2006. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4771–4776.
- Rexroth S, Meyer zu Tittingdorf JM, Krause F, Dencher NA, Seelert H. 2003. Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* 24:2814–2823.
- Rodríguez-Espeleta N, Philippe H, Brinkmann H, Becker B, Melkonian M. 2007. Phylogenetic analyses of nuclear, mitochondrial, and plastid multigene data sets support the placement of Mesostigma in the Streptophyta. *Mol Biol Evol* 24:723–731.
- Schägger H, Von Jagow G. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223–231.
- Schroda M. 2006. RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr Genet* 49:69–84.
- Schwassmann HJ, Rexroth S, Seelert H, Dencher NA. 2007. Metabolism controls dimerization of the chloroplast FoF₁ ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 581:1391–1396.
- Turmel M, Lemieux C, Burger G, Lang BF, Otis C, Plante I, Gray MW. 1999. The complete mitochondrial DNA sequences of *Nephrolepis olivacea* and *Pedinomonas minor*. Two radically different evolutionary patterns within green algae. *Plant Cell* 11:1717–1730.
- Van Lis R, Atteia A, Mendoza-Hernández G, González-Halphen D. 2003. Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol* 132:318–330.
- Van Lis R, Mendoza-Hernandez G, Groth G, Atteia A. 2007. New insights into the unique structure of the FoF₁-ATP synthase from the chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 144:1190–1199.
- Vázquez-Acevedo M, Cardol P, Cano-Estrada A, Lapaille M, Reyes-Prieto A, Remacle C, González-Halphen D. 2006. The mitochondrial ATP synthase of chlorophyte algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomembr* 38:271–282.
- Velours J, Ardin G. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 32:383–390.
- Villavicencio-Quejreiro A, Vázquez-Acevedo M, Cano-Estrada A, et al. (12 co-authors). 2009. The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *J Bioenerg Biomembr* 41:1–13.
- Von Jagow G, Link TA. 1986. Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc₁ complex. *Methods Enzymol* 126:253–271.
- Walker JE, Dickson VK. 2006. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1757:286–296.
- Weber J, Senior AE. 2003. ATP synthesis driven by proton transport in F₀F₁-ATP synthase. *FEBS Lett* 545:61–70.
- Wittig I, Schagger H. 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1777:592–598.
- Wittig I, Schagger H. 2009. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787:672–680.
- Wardon AZ, Lee JH, Mack T, et al. (51 co-authors). 2009. Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science* 324:268–272.



Vol. 52, Nos. 1-2
January - March 2009
April - June 2009
pp. 44 - 57

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Los genomas mitocondriales: ¿Qué nos dicen sobre la evolución de las algas verdes?

E. Rodríguez-Salinas,* D. González-Halphen*

RESUMEN. El número de genomas mitocondriales de algas verdes secuenciados va en aumento constante. Sin embargo, estudios comparativos han revelado que los distintos genomas mitocondriales poseen una organización, estructura y contenido de genes muy diferentes. Durante la historia evolutiva de las algas verdes han ocurrido eventos de transferencia de genes del genoma mitocondrial al genoma nuclear. Esta implacable transferencia de genes ha contribuido a definir el contenido de genes del genoma mitocondrial y a la vez ha incrementado la complejidad del genoma nuclear. En esta revisión se analiza la relación que existe entre la evolución de los genomas mitocondriales y nucleares en el linaje de las algas clorofíceas. También se describen rearrreglos genómicos poco frecuentes que probablemente hayan ocurrido una sola vez a lo largo de la historia evolutiva de este linaje y por lo tanto pueden ser útiles en estudios filogenéticos.

Palabras clave: Evolución de los genomas mitocondriales, algas verdes, fragmentación de genes, ATP sintasa mitocondrial.

ABSTRACT. The number of completely sequenced green algal mitochondrial genomes is expanding rapidly. However, comparative studies have revealed very different mitochondrial genome organizations, structures and gene contents. Gene transfer events from mitochondrial DNA to the nucleus have occurred during the evolutionary history of green algae. This genetic flux has shaped mitochondrial genome content and has increased nuclear genome complexity. This review examines the relationship between mitochondrial and nuclear genome evolution in the chlorophycean lineage of green algae and describes rare genome arrangements that are unlikely to have occurred twice during the evolutionary history of this lineage and therefore can be used in phylogenetic studies.

Key words: Mitochondrial genome evolution, green algae, gene fragmentation, mitochondrial ATP synthase.

INTRODUCCIÓN

Las algas verdes constituyen un grupo de organismos muy diverso. La diversidad se observa a nivel de su hábitat, morfología (Lewis y McCourt 2004), reproducción (Margulis y Schwartz 1998) y a nivel genómico (<http://genome.jgi-psf.org/> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Genomes-Group.cgi?taxid=33090&opt=organelle>). Estudios basados en las características bioquímicas, fisiológicas y estructurales de las plantas terrestres y de las algas verdes sugieren que los ancestros de las algas verdes son los progenitores unicelulares de las plantas (Margulis y Schwartz 1998 y Lewis y McCourt 2004). Actualmente, las plantas terrestres conforman el linaje *Viridiplantae* que se divide en los *phyla* *Streptophyta*, que contiene a las embriofitas y carofitas, y *Chlorophyta*, que contiene a la mayoría de las algas verdes. El *phyla* *Chlorophyta* consiste en tres clases monofiléticas

denominadas *Ulvophyceae*, *Trebouxiophyceae* y *Chlorophyceae*; y en una clase no monofilética denominada *Prasinophyceae*, que contiene algas verdes primitivas (Bullerwell y Gray 2004). Recientemente se ha incluido la clase *Pedinophyceae*, sin embargo su posición filogenética aún se debate (Turmel et al, 1999).

La filogenia es importante y a que refleja la historia de la transmisión de la información genética, asimismo contribuye a guiar la interpretación de cómo y bajo qué circunstancias han ido evolucionando los genomas. Actualmente, existen muy pocos genomas nucleares de algas verdes completamente secuenciados: el de la trebouxiofícea *Chlorrella sp. NC64A* (http://genome.jgi-psf.org/ChINC64A_1/ChINC64A_1.home.html), los de las prasinofíceas *Micromonas pusilla* (<http://genome.jgi-psf.org/MicpuC2/MicpuC2.home.html>), *Micromonas RCC299* (<http://genome.jgi-psf.org/MicpuN2/MicpuN2.home.html>), *Ostreococcus lucimarinus* (http://genome.jgi-psf.org/Ost9901_3/Ost9901_3.home.html) y *Ostreococcus tauri* (<http://genome.jgi-psf.org/Ostta4/Ostta4.home.html>) y los de las clorofíceas *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>) y *Volvox carteri* (<http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>); por lo que es difícil llevar a cabo estudios comparativos que permitan conocer la variación de secuencia de los genes y definir con exactitud las relaciones filogenéticas entre las algas verdes. En cambio, la secuenciación de 10 genomas mi-

First version received: September 29, 2008; first version revised: July 31, 2009; second version received in revised form: August 17, 2009; second version revised: March 30, 2010; accepted: April 26, 2010.

tocondriales pertenecientes a los distintos linajes de algas verdes ha permitido observar que éstos han sufrido cambios radicales en su estructura, composición, organización, contenido de genes y número de copias de genes a lo largo de su evolución. Estas características pueden ser útiles para hacer inferencias acerca de la naturaleza del genoma mitocondrial de su ancestro común (Pombert et al, 2006). El genoma mitocondrial ha sido utilizado ampliamente en estudios de evolución por ser heredado de manera uniparental, por contener una copia única de genes ortólogos y por tener una alta tasa de mutación, utilizada para definir la distancia genética entre organismos cercanamente relacionados y así establecer sus relaciones filogenéticas (Brown et al, 1979 y Barr et al, 2005).

La secuenciación de genomas mitocondriales de los distintos linajes de algas verdes ha revelado que éstos presentan una gran diversidad. Análisis comparativos han permitido contrastar los patrones de organización de los genomas mitocondriales de los distintos linajes de algas verdes. Los factores y los mecanismos responsables de los cambios en contenido, organización y estructura de los genomas mitocondriales que las algas verdes han sufrido a lo largo de su evolución aún no se conocen completamente. ¿Qué fuerzas evolutivas han contribuido a mantener determinados genes en el genoma mitocondrial? ¿Qué posibles implicaciones tiene la transferencia de genes del genoma mitocondrial al nuclear? ¿Qué ha favorecido que ciertos linajes de algas verdes hayan adquirido nuevo material genético? A continuación se discuten algunas características a nivel de organización, estructura, contenido y dinámica de genes que se han observado en los genomas mitocondriales secuenciados de las algas verdes, así como el posible significado que pueden tener a nivel evolutivo. Finalmente, se conjuntan estas observaciones para proponer una nueva aplicación del genoma mitocondrial en la filogenia de las algas clorofíceas.

GENOMAS MITOCONDRIALES

Las mitocondrias son organelos de las células eucariotas cuya función principal es la síntesis de ATP acoplada a la cadena respiratoria, fenómeno conocido como fosforilación oxidativa. La fosforilación oxidativa es una de las rutas bioquímicas más antiguas y conservadas en la mitocondria (Mentel y Martin 2008). Las mitocondrias también participan en la biosíntesis de aminoácidos y de ácidos grasos, en la apoptosis, en la señalización celular (Logan 2007) y en la biogénesis de los centros hierro-azufre.

La teoría más aceptada acerca del origen de la mitocondria es la del endosimbionte, la cual propone que este organelo se originó a partir de un simbiote intracelular bacteriano (Margulis 1975). Análisis filogenéticos de RNA ribosomal (rRNA) indican que el endosimbionte probable-

mente fue una α -proteobacteria (Gray et al, 2001, Katz 2002 y Andersson et al, 2003). La naturaleza del hospedero aún se debate, pero se propone que fue una arqueobacteria (Timmis et al, 2004) o un protoeucariote (Poole y Penny 2007).

Las mitocondrias son organelos intracelulares semiautónomos que contienen su propio genoma. Los genomas mitocondriales actuales son el resultado de una reducción del genoma del endosimbionte original (Gray et al, 1999). Aunque se ha propuesto que tienen el mismo origen, los genomas mitocondriales han evolucionado de manera distinta en los organismos eucariotes (Fauron et al, 1995 y Barr et al, 2005) y presentan una gran diversidad en tamaño, organización y complejidad génica. Los genomas mitocondriales son muy dinámicos, modifican, eliminan y/o reorganizan su material genético y se ha propuesto que incluso pueden adquirir nuevo material genético (Boer y Gray 1988 y Pont-Kingdon et al, 1998).

Los genomas mitocondriales contienen genes que codifican RNAs ribosomales, RNAs de transferencia (tRNA) (Salinas et al, 2008), proteínas de los distintos complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y ocasionalmente algunas proteínas ribosomales (Burger et al, 2003). No obstante, a pesar de que la información contenida en el genoma mitocondrial está conservada entre los eucariotes, el genoma mitocondrial se caracteriza por una gran diversidad en estructura, tamaño, contenido de genes y organización en los distintos organismos eucariotes (Gray et al, 1999 y Burger et al, 2003).

DIVERSIDAD DE LOS GENOMAS MITOCONDRIALES

La mayoría de los genomas mitocondriales presentan una estructura circular, por ejemplo el de humano (Saccone et al, 2006). Existen genomas mitocondriales lineales como es el caso de los apicomplejos como *Plasmodium falciparum* (Conway et al, 2000) o de algunas algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* (Boer y Gray 1988). Otros genomas mitocondriales están compuestos por más de una molécula como en los siguientes ejemplos. El genoma mitocondrial del hongo *Spizellomyces punctatus* consiste en tres moléculas circulares (Burger et al, 2003). El genoma mitocondrial del alga verde *Polytomella parva* consiste en dos cadenas lineales de 13.5 y 3.5 kpb, respectivamente (Fan y Lee 2002). El genoma mitocondrial del metazoario *Amoebidium parasiticum* está fragmentado en más de 80 moléculas (Bullerwell y Gray 2004). El genoma mitocondrial de los kinetoplastidos *Tripanosoma* consiste en concatenámeros de DNA. Cada concatenámero contiene aproximadamente una docena de maxicírculos (20 a 40 kb) y miles de mini-círculos (0.5 a 2.5 kb). Los maxicírculos codifican proteínas y rRNA y los minicírculos codifican

RNAs guía que participan en la edición de los RNA mensajeros (Morris et al, 2001).

La secuenciación de los diversos genomas mitocondriales ha demostrado que el contenido de genes es independiente del tamaño del genoma mitocondrial (Burger et al, 2003). El genoma mitocondrial del protozooario *Reclinomonas americana* es el que presenta el mayor contenido de genes; tiene un tamaño de 69 kpb, contiene 97 genes y codifica 67 proteínas (Lang et al, 1997). Los genomas mitocondriales secuenciados de los apicomplejos constituyen a la fecha los genomas mitocondriales con el menor contenido de genes. Por ejemplo, el genoma mitocondrial de *P. falciparum* tiene un tamaño menor a 6 kpb y contiene tres genes que codifican tres proteínas, respectivamente (Conway et al, 2000). En cambio, los genomas mitocondriales de las plantas tienen un tamaño de más de 200 kpb, pero en general contienen menos genes que el genoma mitocondrial de *R. americana*. Por ejemplo, el genoma mitocondrial de la planta *Physcomitrella patens* tiene un tamaño de más de 100 kpb, contiene 69 genes y codifica 42 proteínas (Terasawa et al, 2007).

Existen genomas mitocondriales que presentan un patrón de organización similar al de su ancestro bacteriano: en su mayoría son codificantes, prácticamente no contienen intrones; contienen genes que codifican todos los tRNA necesarios y tienen un uso de codones universal (Gray et al, 1999). Algunos ejemplos de este tipo de genomas mitocondriales son los de animales, hongos y plantas (Gray et al, 1999). Sin embargo, hay genomas mitocondriales que presentan un patrón distinto al de su ancestro bacteriano: presentan una notable reducción en el contenido de genes, presentan genes que codifican rRNA fragmentados y dispersos; y tienen un uso de codones no universal. Tal es el caso de los genomas mitocondriales de algunas algas verdes.

GENOMAS MITOCONDRIALES DE ALGAS VERDES

Actualmente se han secuenciado y anotado en el GenBank (NCBI) 10 genomas mitocondriales de algas verdes. Uno de ellos pertenece al linaje de las trebouxiofitas, *Prototheca wickerhamii* (U02970) (Wolff et al, 1994), uno al linaje de las pedinofitas, *Pedinomonas minor* (AF116775) (Turmel et al, 1999), dos al linaje de las ulvofitas, *Pseudodictyonium akinetum* (AY359242) (Pombert et al, 2004) y *Oltmannsiellopsis viridis* (DQ365900) (Pombert et al, 2006), dos al linaje de las prasinofitas, *Ostreococcus tauri* (CR954200) (Robbens et al, 2007) y *Nephroselmis olivacea* (AF110138) (Turmel et al, 1999) y cuatro al linaje de las clorofitas, *Chlamydomonas eugametos* (AF008237) (Denovan-Wright et al, 1998), *Chlamydomonas reinhardtii* (U03843) (Vahrenholz et al, 1993), *Polytomella capuana* (EF645804) (Smith y Lee 2008) y *Scenedesmus obliquus* (X17375) (Nedelcu et al, 2000). En las algas verdes se han

descrito dos tipos de genomas: el ancestral y el reducido. Los genomas de tipo ancestral tienen un tamaño de 45 a 96 kpb; contienen genes que codifican proteínas ribosomales, proteínas de la cadena respiratoria, rRNA y el juego completo de genes que codifican todos los tRNA (Nedelcu et al, 2000) (Tabla 1). Los genes que codifican rRNA están localizados de manera continua en el genoma mitocondrial. Los genomas mitocondriales del alga trebouxiofitas *P. wickerhamii* (U02970), de las algas ulvofitas *P. akinetum* (AY359242) y *O. viridis* (DQ365900), y de las algas prasinofitas *O. tauri* (CR954200) y *N. olivacea* (AF110138), son de tipo ancestral (Pombert et al, 2006). Los genomas de tipo reducido tienen un tamaño de 13 a 25 kpb; carecen de genes que codifican proteínas ribosomales y solamente contienen algunos de los genes que codifican rRNA, proteínas de la cadena respiratoria y tRNA. Los genes que codifican los rRNA están fragmentados y localizados de manera dispersa en el genoma mitocondrial. Los genomas mitocondriales del alga pedinofita, *P. minor*, de las algas clorofitas, *C. eugametos* (AF008237), *C. reinhardtii* (U03843), y *P. capuana* (EF645804), son de tipo reducido (Tabla 1).

El porcentaje del genoma mitocondrial que es codificante va del 41% al 61% en la mayoría de los genomas secuenciados de algas verdes. La excepción la constituye el genoma mitocondrial de *S. obliquus*, cuyo porcentaje de genoma codificante es del 38% (Tabla 2). El genoma mitocondrial del alga clorofita *S. obliquus* se considera como un intermediario evolutivo entre los genomas de las algas verdes (Nedelcu et al, 2000). El genoma mitocondrial de *S. obliquus* tiene un tamaño menor (aproximadamente 43 kpb) que el del genoma de tipo ancestral de *N. olivacea* (aproximadamente 45 kpb) y mayor que el del genoma de tipo reducido de *P. minor* (aproximadamente 25 kpb) (Tabla 2). La densidad de genes en *S. obliquus* (del 60.6%) es la menor que se ha descrito hasta ahora en los genomas mitocondriales secuenciados de algas verdes. El genoma mitocondrial de *S. obliquus* contiene 42 genes, contra 62 genes que contienen aproximadamente los genomas de tipo ancestral y contra 12 genes que contienen en promedio los genomas reducidos (Tabla 2). Además, los genes que codifican rRNA están fragmentados y localizados de manera dispersa, como en los genomas mitocondriales de tipo reducido (Nedelcu et al, 2000).

INTRONES

Los intrones son elementos integrales de los genomas eucariontes que participan de manera activa en la evolución de genes mediante los fenómenos de procesamiento alternativo e intercambio de exones (Fedorova y Fedorov 2003). Los genomas de organelos celulares contienen dos tipos de intrones: de grupo I y de grupo II. Los intrones de

grupo I codifican endonucleasas, sitio específico que catalizan su propagación a otros genes. Los intrones de grupo II son elementos genéticos móviles autocatalíticos (Haugen et al, 2005).

Existen variaciones en el número, el grupo y la localización de intrones reportados entre los genomas mitocondriales secuenciados de las algas verdes: *O. tauri*, *C. reinhardtii* y *P. capuana* no tienen intrones en sus genomas mitocondriales; *P. akinetum*, *O. viridis*, *P. wickerhamii*, *N. olivacea*, *S. obliquus* y *C. eugametos* contienen intrones de grupo I y *O. viridis*, *S. obliquus* y *P. minor* contienen intrones de grupo II (Tabla 2). Las algas verdes anteriores que contienen intrones de grupo I, presentan uno o más de estos intrones en los genes que codifican rRNA. Las algas *P. akinetum* (Wolff et al, 1994), *O. viridis* (Pombert et al, 2006), *N. olivacea* (Turmel et al, 1999) y *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998) contienen un intrón de grupo I en el gen *cox1*. Las algas *P. akinetum* (Wolff et al, 1994), *P. wickerhamii* (Wolff et al, 1994), y *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998) contienen uno o más intrones de grupo I en el gen *cox1*. Las clorofíceas *S. obliquus* (Nedelcu et al, 2000) y *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998) contienen uno o más intrones de grupo I en el gen *nad5*. Las algas *P. akinetum* (Wolff et al, 1994) y *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998) contienen un intrón de grupo I en los genes *atp1* y *nad1*, respectivamente. En cuanto a los intrones de grupo II, se observa que *S. obliquus* (Nedelcu et al, 2000) y *P. minor* (Turmel et al, 1999) contienen un intrón de grupo II en uno o más genes que codifican rRNA. Finalmente, *O. viridis* contiene un intrón de grupo II en el gen *cox1* (Pombert et al, 2006).

La presencia de intrones en los genomas mitocondriales en las distintas algas puede ser útil para describir las relaciones filogenéticas entre los linajes de algas verdes. La presencia de intrones de un mismo grupo en los mismos genes de distintas algas podría sugerir que los intrones hayan sido heredados verticalmente de un ancestro mitocondrial común de las algas verdes. Será interesante determinar si los intrones conservan la secuencia, la estructura y una posición equivalente en los genes de las distintas algas verdes, ya que esto podría contribuir a identificar eventos de transferencia horizontal (Gray et al, 1998).

CONTENIDO DE GENES

Los genomas mitocondriales secuenciados de algas verdes revelan que el contenido de genes varía en los distintos linajes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33090&opt=organelle>). De los genes contenidos en el genoma mitocondrial se les ha dado atención principalmente a aquellos que codifican proteínas que participan en la fosforilación oxidativa. En esta ruta metabólica interaccionan proteínas

codificadas por genes mitocondriales y nucleares (Saccone et al, 2006).

Los genomas mitocondriales secuenciados de las algas verdes presentan diferencias en cuanto al contenido de genes que codifican distintas subunidades de los complejos I, IV y V de la cadena respiratoria (Tabla 1). Los genomas mitocondriales de las algas prasinofíceas *O. tauri* (Robbens et al, 2007) y *N. olivacea* (Turmel et al, 1999) contienen todo el conjunto de genes clásicos mitocondriales que codifican para subunidades de los complejos I, IV y V. En cuanto a los genes que codifican componentes del complejo I se observan variaciones. El alga trebuxofícea *P. wickerhamii* (Wolff et al, 1994) y las algas ulvofíceas *O. viridis* y *P. akinetum* (Pombert et al, 2006) carecen del gen *nad10* del complejo I. El alga ulvofícea *P. akinetum* (Pombert et al, 2006) y el alga pedinofícea *P. minor* (Turmel et al, 1999) carecen, además del gen *nad10*, del gen *nad9*. Los genomas mitocondriales de las clorofíceas *S. obliquus* (Nedelcu et al, 2000), *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998), *C. reinhardtii* (Vahrenholz et al, 1993) y *P. capuana* (Smith y Lee 2008) carecen de los genes *nad7*, *nad9* y *nad10*. Además, las algas *C. eugametos* (AF008237) (Denovan-Wright et al, 1998), *C. reinhardtii* (U03843) (Vahrenholz et al, 1993) y *P. capuana* (EF645804) (Smith y Lee 2008) que son muy cercanas filogenéticamente, carecen de los genes *nad3*, *nad4L*, *nad7*, *nad9* y *nad10*.

En cuanto a los genes que codifican componentes del complejo IV se observa que los genomas mitocondriales del alga pedinofícea *P. minor* (Turmel et al, 1999) y de las algas clorofíceas *S. obliquus* (Funes et al, 2002), *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998), *C. reinhardtii* (Pérez-Martínez et al, 2000 y Pérez-Martínez et al, 2001) y *P. capuana* (Smith y Lee 2008) carecen de los genes *cox2* y *cox3* (Tabla 1). La ausencia del gen *cox2* en el genoma mitocondrial constituye un caso único entre las algas verdes y entre los parásitos apicomplejos (Pérez-Martínez et al, 2001 y Funes et al, 2002). Como se discutirá más adelante, en el caso de *S. obliquus* el gen *cox2* también está fragmentado; pero *cox2a* permanece en el genoma mitocondrial (AAF72052), mientras que *cox2b* ha migrado al genoma nuclear (AAO27881) (Funes et al, 2002).

Respecto a los genes que codifican componentes del complejo V, se observa que los genomas mitocondriales de las algas prasinofíceas, ulvofíceas y trebuxofíceas contienen los genes *atp1*, *atp4*, *atp6*, *atp8* y *atp9* que codifican las distintas subunidades del estator de la ATP sintasa mitocondrial (Tabla 1). Los genomas mitocondriales del alga pedinofícea *P. minor* (Turmel et al, 1999) y de la clorofícea *S. obliquus* (Nedelcu et al, 2000) contienen el gen *atp6*. Además, el genoma mitocondrial de *P. minor* (Turmel et al, 1999) contiene el gen *atp8* y el de *S. obliquus* contiene el gen *atp9*. Los genomas mitocondriales de las algas clo-

rofiticas *C. eugametos* (AF008237) (Denovan-Wright et al, 1998), *C. reinhardtii* (U03843) (Vahrenholz et al, 1993) y *P. capuana* (EF645804) (Smith y Lee 2008) constituyen un caso notable ya que ninguno de ellos contiene genes que codifican subunidades del estator de la ATP sintasa, como se discutirá más adelante (Tabla 1).

Las algas prasinofíceas *N. olivacea* (Turmel et al, 1999), *O. tauri* (Robbens et al, 2007), el alga trebuxofícea *P. wickerhamii* (Wolff et al, 1994) y las ulvofíceas *O. viridis* (Pombert et al, 2006) y *P. akinetum* (Pombert et al, 2004) que tienen un genoma mitocondrial de tipo ancestral, es decir semejante al de *R. americana*, contienen el conjunto completo o casi completo de genes que codifican todos los tRNA necesarios para sintetizar las proteínas que codifican (Tabla 1). En algunos genomas mitocondriales de algas verdes se ha observado que existen variaciones en el código genético (Nedelcu et al, 2000). Los genomas mitocondriales de tipo ancestral tienen una preferencia por la terminación con el nucleótido A o T en la tercera posición del codón. El alga pedinofícea *P. minor* y las algas clorofíceas *C. reinhardtii* y *C. eugametos* tienen un genoma mitocondrial de tipo reducido y carecen de la mayoría de los genes que codifican todos los tRNA necesarios para la síntesis de proteínas (Tabla 1). Éstas también tienen una preferencia por la terminación con el nucleótido A o T en la tercera posición del codón. Sin embargo, *P. minor* utiliza el codón de terminación UGA para codificar un triptófano (Turmel et al, 1999). El alga clorofícea *S. obliquus* utiliza un código genético diferente donde el codón de terminación UAG codifica para leucina y el codón UCA para la terminación. *S. obliquus* no tiene una preferencia por la terminación con el nucleótido A o T en la tercera posición del codón (Nedelcu et al, 2000).

El uso de un código genético alternativo es una característica distintiva de los genomas mitocondriales. La plasticidad manifestada en la tercera posición del codón podría verse reflejada en el uso de una menor cantidad de tRNA para la síntesis de proteínas. Así, la plasticidad manifestada en la tercera posición del codón junto con la ausencia de algunos genes que codifican tRNA pueden ser factores que contribuyen a la variación de los códigos genéticos mitocondriales (Knight et al, 2001). Además, en los eucariontes en general, la importación de tRNA del citoplasma a la mitocondria es esencial para los procesos biosintéticos de la mitocondria y en consecuencia para la viabilidad celular (Salinas et al, 2008).

Una ventaja de la secuenciación completa de los genomas mitocondriales es que permite conocer el orden en que se encuentran los genes. En este trabajo hemos realizado un análisis *in silico* de los genomas mitocondriales secuenciados de las algas verdes y tomando en cuenta solamente aquellos que codifican proteínas de la cadena respiratoria; se observa que hay arreglos de genes contiguos que están presentes

en diferentes linajes (Tabla 3). Un ejemplo es el arreglo de genes [*cox2-cox3*] que se encuentra en el genoma mitocondrial de las prasinofíceas *N. olivacea* (GeneID: 4178032 y 4178033) y *O. tauri* (GeneID: 4238905 y 4238906), en la ulvofícea *O. viridis* (GeneID: 4200888 y 4200889) y en la trebuxofícea *P. wickerhamii* (GeneID: 802128 y 802127). Sin embargo, en *P. wickerhamii* los genes están orientados en dirección inversa [*cox3-cox2*], y se localizan en la cadena no codificante del genoma. A continuación se mencionan otros ejemplos. El arreglo [*atp1-nad1*] se encuentra en la ulvofícea *P. akinetum* (GeneID: 2847073 y 2847036) y en la trebuxofícea *P. wickerhamii* (GeneID: 802120 y 802115). El arreglo [*nad4-nad5*], en donde ambos genes se localizan en la cadena no codificante del genoma, se encuentra en la trebuxofícea *P. wickerhamii* (GeneID: 802106 y 802112), en las prasinofíceas *N. olivacea* (GeneID: 4178018 y 4178017) y *O. tauri* (GeneID: 4238861 y 4238864) y en la clorofícea *C. reinhardtii* (GeneID: 801494 y 801492). En *N. olivacea* los genes están orientados en dirección inversa y se localizan en la cadena codificante del genoma. El arreglo [*nad4-nad2*] se encuentra en las prasinofíceas *N. olivacea* (GeneID: 4178018 y 4178019) y *O. tauri* (GeneID: 4238861 y 4238925), en las clorofíceas *Chlamydomonas elongatum* (GeneID: 800378 y 800383) y *P. capuana* (GeneID: 5952269 y 5952285) y en la pedinofícea *P. minor* (GeneID: 800406 y 800409). En *O. tauri* los genes están orientados en dirección inversa y se localizan en la cadena no codificante del genoma. El arreglo [*cox1-nad4*] se encuentra en la trebuxofícea *P. wickerhamii* (GeneID: 802105 y 802106), en la pedinofícea *P. minor* (GeneID: 800402 y 800406) y en las clorofíceas *S. obliquus* (GeneID: 802057 y 802067) y *P. capuana* (GeneID: 5952274 y 5952269). En la trebuxofícea *P. wickerhamii* ambos genes se localizan en la cadena codificante del genoma. El arreglo [*nad5-nad4L*] se encuentra en la ulvofícea *O. viridis* (GeneID: 4200929 y 4200930) y en la clorofícea *S. obliquus* (GeneID: 802065 y 802068). Finalmente, el arreglo [*cob-cox1*] se encuentra en la prasinofícea *O. tauri* y en las clorofíceas *C. eugametos* (GeneID: 800379 y 800385) y *P. capuana* (GeneID: 5952284 y 5952274). En *O. tauri*, los genes *cox1* y *cob* están duplicados (GeneID: 4238907, 4238908 y 4238903, 4238904). En la cadena codificante está el arreglo [*cox1-cob*] y en la cadena no codificante se encuentra el duplicado de los genes en dirección inversa. En la clorofícea *P. capuana*, el gen *cob* se localiza en la cadena no codificante del genoma (Tabla 3).

Algunos arreglos de genes parecen estar presentes solamente en un linaje. Por ejemplo, los siguientes arreglos de genes que se encuentran solamente en las prasinofíceas *N. olivacea* y *O. tauri*: los genes [*atp6-nad6*] (*N. olivacea* GeneID: 4178029 y 4178030, y *O. tauri* GeneID: 4238898 y 4238865), donde el gen *atp6* se localiza en la cadena no codificante del genoma, y los genes [*nad5-nad4-nad2*]. En *O. tauri* los genes

Tabla 1. Comparación del contenido de genes en los genomas mitocondriales secuenciados de algas verdes.

Gen mitocondrial	No ^a	O ^a	Pw ^a	Ov ^a	Pa ^a	Pm ^a	Sa ^a	Ce ^a	Cr ^a	Pe ^a
Proteínas del Complejo I										
<i>nad1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad3</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>nad4</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad4L</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>nad5</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad6</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nad7</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>nad9</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>nad10</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteínas del Complejo III										
<i>cob</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteínas del Complejo IV										
<i>cox1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cox2</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>cox3</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Proteínas del Complejo V										
<i>atp1</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>atp4</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>atp6</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>atp8</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>atp9</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Transcriptasa reversa										
<i>rtf</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Proteínas ribosomales de la subunidad grande										
<i>rpl5</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>rpl6</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>rpl14</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rpl16</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Proteínas ribosomales de la subunidad pequeña										
<i>rps2</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps3</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps4</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>rps7</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>rps8</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rps10</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>rps11</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps12</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps13</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps14</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps19</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
RNAs ribosomales										
<i>ml</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ms</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>rn</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RNAs de transferencia	26	26	26	24	25	8	27	3	3	1

No, *Nephroselmis olivacea* (NC_006239); OI, *Ostreococcus tauri* (NC_006290); Pw, *Prototheca wickerhamii* (NC_001613); Pa, *Pseudonocardium akinetum* (NC_005926); Ov, *Oltmannsiellopsis viridis* (NC_008256); Pm, *Pedinomonas minor* (NC_000882); Sa, *Scenedesmus obliquus* (NC_002254); Ce, *Chlamydomonas eugametos* (NC_001872); Cr, *Chlamydomonas reinhardtii* (NC_001638); Pe, *Polytomella capuana* (NC_010357).

^a Datos obtenidos de Nedelcu 2000

^b Datos obtenidos mediante análisis de los genomas mitocondriales publicados en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33080&opt=organelle>

^c genes duplicados

^d genes fragmentados

[*nad5-nad4-nad2*] están orientados en dirección inversa y se localizan en la cadena codificante del genoma. La presencia del arreglo [*nad5-nad4-nad2*] es característica de los genomas que presentan un patrón de organización similar al de su ancestro bacteriano (Lang et al, 1997). Esto coincide con el hecho de que las algas del linaje de las prasinofíceas tienen un genoma mitocondrial de tipo ancestral. Además, tomando en cuenta que los genomas mitocondriales de *N. olivacea* y *O. tauri* tienen una estructura circular, se observa que ambas conservan el siguiente arreglo: [*atp6-nad6-cox2-cox3-nad5-nad4-nad2*] (con la inversión respectiva de los genes *nad5*, 4 y 2 en *O. tauri*) (Tabla 3).

La preservación del orden preciso de los genes en los genomas mitocondriales (sintenia), así como la presencia o la ausencia de genes, son importantes a nivel evolutivo. El orden de los genes en un genoma en general está preserva-

do en los organismos que son filogenéticamente cercanos. Además, la conservación del orden de genes puede dar información acerca de eventos de recombinación. En el caso de las algas verdes, es posible que algunos arreglos de genes sean características exclusivas de un linaje particular y por lo tanto sean útiles para resolver controversias en cuanto a su clasificación entre los distintos linajes de algas verdes. Normalmente se considera que dos o más linajes están relacionados si éstos presentan características morfológicas compartidas, ya que se piensa que estas características provienen de su ancestro común (Tamames 2001).

ESTRUCTURA

La mayoría de las algas clorofíceas presentan genomas mitocondriales con estructura circular, como es el caso de

Tabla 2. Características de los genomas mitocondriales secuenciados de algas verdes.

Alga	Topología	Tamaño (pb)	Genoma codificante (%)	Genes	Proteínas	RNAs estructurales	% G y C	Intrones			
								Grupo I	Gen	Grupo II	Gen
Pa ^a	circular	95880	49%	94	72	27	39%	7	<i>mi</i> (1) <i>atp1</i> (1) <i>cox1</i> (4) <i>cob</i> (1)	0	
Ov ^a	circular	56781	53%	63	36	27	33%	2	<i>mi</i> (1) <i>cob</i> (1)	1	<i>cox1</i> (1)
Pw ^a	circular	55328	52%	63	36	29	25%	5	<i>im</i> (2)* <i>cox1</i> (3)	0	
No ^a	circular	45223	62%	70	40	30	32%	4	<i>mi</i> (3) <i>cob</i> (1)	0	
Ot ^a	circular	44237	68%	78	43	35	38%	0		0	
So ^a	circular	42781	38%	53	20	33	36%	2	<i>mi4</i> (1) <i>nad5</i> (1)	2	<i>mi4</i> (1) <i>ms</i> (1)
Pm ^a (1)	circular	25137	41%	23	11	12	22%	0		1	<i>rnl_a</i>
Ce ^a	circular	22887	54%	20	14	13	34%	9	<i>mi_b</i> (1) <i>mi_e</i> (1) <i>mi_f</i> (2) <i>cob</i> (1) <i>cox1</i> (1) <i>nad7</i> (1) <i>nad5</i> (2)	0	
Cr ^a	lineal	15758	58%	25	8	17	45%	0			0
Pc ^a	lineal	12988	61%	21	7	13	57%	0			0

Pa, *Pseudonocardium akinetum* (NC_005826); Ov, *Oltmannsiellopsis viridis* (NC_008256); Pw, *Prototheca wickerhamii* (NC_001613); No, *Nephroselmis olivacea* (NC_008238); Ot, *Ostreococcus tauri* (NC_008290); So, *Scenedesmus obliquus* (NC_002254); Pm, *Pedinomonas minor* (NC_000892); Ce, *Chlamydomonas eugametos* (NC_001872); Cr, *Chlamydomonas reinhardtii* (NC_001638); Pc, *Polytomella capuana* (NC_010357).

^a Datos obtenidos mediante análisis de los genomas mitocondriales publicados en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33090&opt=organelle>

^b Datos obtenidos de Nedeleu 2000

*mismo que gen *mi*

P. wickerhamii (Wolff et al, 1994), *P. akinetum* (Pombert et al, 2004), *O. viridis* (Pombert et al, 2006), *O. tauri* (Robbens et al, 2007), *N. olivacea* (Turmel et al, 1999), *P. minor* (Turmel et al, 1999), *S. obliquus* (Nedelcu et al, 2000) y *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998). También existen algas verdes que presentan genomas mitocondriales lineales; hasta ahora solamente se han encontrado en el linaje de las clorofíceas. El genoma mitocondrial de *C. reinhardtii* es lineal, tiene un tamaño de 15.8 kpb y tiene regiones teloméricas (Fan y Lee 2002). El 58% del genoma mitocondrial codifica proteínas y RNAs (Tabla 2). El genoma restante representa DNA no codificante que consiste en regiones intergénicas y en secuencias teloméricas. Las secuencias teloméricas son extensiones de cadena sencilla con secuencias repetidas invertidas de 580 pb aproximadamente (Smith y Lee 2008).

Polytomella es un grupo de algas que pertenece al clado *Reinhardtii* y que ha perdido la pared celular y el aparato fotosintético (van Lis 2005). El genoma mitocondrial de *P. parva* aún no ha sido completamente secuenciado, pero se ha observado que consiste en dos fragmentos lineales de 13.5 kpb y 3.5 kpb, respectivamente. El fragmento de 3.5 kpb codifica solamente un gen, *nad6*. Las regiones teloméricas de ambos fragmentos contienen secuencias repetidas invertidas de aproximadamente 1.3 kpb (Fan y Lee 2002). El genoma mitocondrial de *P. capuana* consiste en una molécula lineal de aproximadamente 13 kpb con secuencias teloméricas de 530 pb (Smith y Lee 2008). El 61% del genoma mitocondrial codifica proteínas y RNAs (Tabla 2). El genoma restante representa DNA no codificante que con-

siste en regiones intergénicas y en secuencias teloméricas. Las regiones codificantes están organizadas en dos grupos de distinto tamaño con polaridades transcripcionales opuestas. Las secuencias teloméricas de *P. capuana* consisten en secuencias repetidas invertidas que abarcan DNA codificante y no codificante y existen en una conformación cerrada o abierta (Smith y Lee 2008).

Una característica particular del genoma de *P. capuana* es que presenta el mayor contenido de los nucleótidos G y C de todos los genomas mitocondriales completamente secuenciados de las algas verdes. El porcentaje de G y C del genoma mitocondrial en *P. capuana* es de 57% mientras que en *C. reinhardtii* es de 45% y en las demás algas es de 30% (Tabla 2). Se ha propuesto que las secuencias cortas repetidas ricas en G y C son regiones que pueden actuar como blancos de recombinación y así ocasionar rearrreglos genómicos (Smith y Lee 2008). Smith y Lee, de manera teórica, utilizaron una porción de una secuencia corta invertida repetida en la región intergénica de los genes *nad6* y *cob* de *P. capuana* (GeneID: 5952281 y 5952284) y secuencias homólogas en las regiones teloméricas para generar mediante recombinación ilegítima, productos similares a los dos fragmentos lineales de 13.5 kpb y 3.5 kpb del genoma mitocondrial de *P. parva* (Smith y Lee 2008). Así, la recombinación constituye un factor que puede influenciar tanto la estructura de los genomas mitocondriales como el orden de los genes en el genoma.

La presencia de secuencias cortas repetidas dispersas probablemente tiene un papel importante en los rearrreglos de los genomas mitocondriales de las algas verdes (Nedelcu

Tabla 3. Orden de genes en los genomas mitocondriales secuenciados de algas verdes.

Alga	Orden de genes
<i>Pa</i>	<i>cox1</i> -(<i>nad6</i>)- <i>nad3</i> - <i>atp8</i> - <i>nad2</i> -(<i>cox3</i>)-(atp4)-(atp6)-(nad7)-(cob)-(nada4)-(nada4L)-(atp9)-atp1- <i>nad1</i> - <i>nad5</i> - <i>cox2</i>
<i>Ov</i>	<i>nad6</i> - <i>nad4</i> -(cob)-(atp4)- <i>nad9</i> -(nada3)-(nada7)-(atp9)-(atp1)- <i>nad2</i> - <i>nad5</i> - <i>nad4L</i> -atp6-atp8- <i>cox1</i> - <i>cox2</i> - <i>cox3</i>
<i>Pw</i>	(<i>cox1</i>)-(nada4)-(nada5)-(nada7)-(cox3)-(cox2)-(atp8)-(nada9)-(cob)-(atp6)-(nada3)- <i>nad6</i> - <i>nad4L</i> -atp1- <i>nad1</i> -atp9- <i>nad2</i>
<i>No</i>	<i>nad5</i> - <i>nad4</i> - <i>nad2</i> -atp9-(<i>cox1</i>)-(nada9)-(nada10)- <i>nad4L</i> -atp8-(nada1)-(cob)-(nada3)-(nada7)-(atp1)-(atp6)- <i>nad6</i> - <i>cox2</i> - <i>cox3</i>
<i>Ot</i>	(atp9)- <i>nad7</i> - <i>nad3</i> -(atp1)-(nada9)- <i>nad4L</i> _1-atp8_1- <i>cox1</i> _1-cob-(nada1)-(atp6)- <i>nad6</i> - <i>cox2</i> - <i>cox3</i> -(nada2)-(nada4)-(nada5)-(cob)-(cox1_2)-(atp8_2)-(nada4L_2)
<i>So</i>	<i>cox2</i> - <i>nad5</i> - <i>nad4L</i> - <i>nad3</i> - <i>cox3</i> - <i>nad1</i> -(atp6)- <i>nad2</i> - <i>cox1</i> - <i>nad4</i> - <i>nad6</i> -cob-atp9
<i>Pm</i>	atp8- <i>nad5</i> -atp6- <i>nad4L</i> - <i>cox1</i> - <i>nad4</i> - <i>nad2</i> - <i>nad1</i> - <i>nad6</i> - <i>nad3</i> -cob
<i>Ce</i>	<i>nad6</i> - <i>nad4</i> - <i>nad2</i> -cob- <i>cox1</i> - <i>nad1</i> - <i>nad5</i>
<i>Cr</i>	(cob)-(nada4)-(nada5)- <i>cox1</i> - <i>nad2</i> - <i>nad6</i> - <i>nad1</i>
<i>Pc</i>	(<i>nad6</i>)-(cob)- <i>cox1</i> - <i>nad4</i> - <i>nad2</i> - <i>nad5</i> - <i>nad1</i>

Pa, *Pseudoclonium akinetum* (NC_005826); *Ov*, *Oltmannsiellopsis viridis* (NC_008256); *Pw*, *Prototheca wickerhamii* (NC_001613); *No*, *Nephroselmis olivacea* (NC_006238); *Ot*, *Ostreococcus tauri* (NC_006290); *So*, *Soenedesmus obliquus* (NC_002254); *Pm*, *Pedinomonas minor* (NC_000892); *Ce*, *Chlamydomonas eugametos* (NC_001872); *Cr*, *Chlamydomonas reinhardtii* (NC_001838); *Pc*, *Polytomella capuana* (NC_010357).

() cadena complementaria

Datos obtenidos mediante análisis de los genomas mitocondriales publicados en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33090&opt=erganelle>. Los arreglos atp1-*nad*, *nad5*-*nad4L*, *cox2*-*cox3*, *nad4*-*nad5*, atp6-*nad6* y *cox1*-*nad4* se indican sombreados con gris, los arreglos *nad4*-*nad2*, cob-*cox1* y *nad5*-*nad4*-*nad2* se indican subrayados y el arreglo atp6-*nad6*-*cox2*-*cox3*-*nad5*-*nad4*-*nad2* se indica con un rectángulo.

y Lee 1998). La recombinación intramolecular que se lleva a cabo utilizando secuencias repetidas directas o invertidas es común en las plantas y genera formas isoméricas del cromosoma principal y moléculas subgenómicas de DNA circulares (Fan y Lee 2002). Asimismo, se ha propuesto que las secuencias repetidas pueden representar cicatrices de eventos de inserción o delección (Nedelcu y Lee 1998). El número, la localización y la orientación de las secuencias repetidas contribuyen a determinar la organización, la complejidad y la función del genoma mitocondrial (Fan y Lee 2002). La presencia de secuencias repetidas se ha descrito en todos los miembros del linaje de las clorofíceas, aunque su abundancia es variable. Las secuencias cortas repetidas de las algas verdes con un genoma mitocondrial de tipo ancestral son ricas en los nucleótidos A y T y tienen un tamaño de 6 a 17 pb; y aquellas con un genoma mitocondrial de tipo reducido son ricas en G y C y tienen un tamaño de 9 a 14 pb (Nedelcu y Lee 1998). Se ha propuesto que las secuencias cortas repetidas ricas en G y C son regiones que pueden actuar como blancos para la recombinación y así ocasionar rearrreglos genómicos (Smith y Lee 1998). Se ha sugerido que a las estructuras cruciformes que forman las regiones ricas en G y C pueden ser reconocidas por enzimas involucradas en la resolución de los intermediarios de recombinación (Dieckman y Gandy 1987). Así, mediante procesos de recombinación intramolecular mediados por secuencias cortas repetidas, se ha propuesto que las algas clorofíceas han eliminado muchas regiones codificantes de sus genomas mitocondriales y han localizado de manera dispersa los genes que codifican rRNA.

El alga prasinofícea *O. tauri* es el organismo eucariote unicelular más pequeño descrito a la fecha con un tamaño de 1 µm de diámetro. El genoma mitocondrial de *O. tauri* tiene una característica única respecto a los demás genomas mitocondriales de las algas verdes: la presencia de un segmento duplicado de aproximadamente 20 kpb. El segmento duplicado contiene un marco abierto de lectura denominado *orf129*, que no presenta homólogos en análisis hechos por BLAST, cinco genes que codifican proteínas (*cob*, *cox1*, *atp4*, *atp8* y *nad4L*) y cinco genes que codifican RNAs. Las regiones duplicadas son 100% idénticas en secuencia y abarcan un 44% del genoma mitocondrial. El genoma mitocondrial de *O. tauri* presenta la mayor densidad de genes que se ha descrito hasta ahora en los genomas mitocondriales de algas verdes (93%) (Robbens et al, 2007) (Tabla 2).

El evento de duplicación en *O. tauri* es importante ya que la duplicación de una región del genoma es un mecanismo evolutivo que contribuye a incrementar la complejidad de los genomas durante el curso de su evolución. La duplicación de genes, de regiones de genomas o de genomas completos es un mecanismo molecular por el cual se pueden formar nuevos genes (Babushok et al, 2007). Se ha sugerido

que la duplicación de grupos de genes contiguos probablemente es el resultado de eventos desiguales de recombinación homóloga. Se estima que la duplicación de segmentos en los genomas eucariotes ocurre con una frecuencia muy baja de 0.01 por gen por millón de años (Schmidt y Davies 2007). Los efectos de eventos de duplicación incluyen la regulación de genes, ejercer como un amortiguador de mutaciones donde la copia no mutada puede complementar o sustituir a la mutada, o la pérdida total o parcial mediante eliminación o degeneración de alguna de las copias (Babushok et al, 2007). Ambos genes pueden sufrir mutaciones que modifiquen completamente sus funciones o que les permitan adquirir funciones independientes. Asimismo, las regiones reguladoras de ambas copias pueden divergir de tal manera que permitan la expresión espacial y temporal diferente de una o de ambas copias de genes (Sugino e Innan 2006 y Louis 2007).

TRANSFERENCIA DE GENES

Transferencia horizontal

Existe un par de genomas mitocondriales de algas verdes que sugieren eventos recientes de adquisición de genes por transferencia horizontal. La transferencia horizontal se puede detectar mediante el descubrimiento de genealogías genéticas discordantes, mediante el uso de patrones inusuales de la presencia o ausencia de genes en los genomas o mediante patrones aberrantes en la preferencia en el uso de codones (Katz 2002).

El producto del gen *rtf* es una proteína que potencialmente es semejante a una transcriptasa reversa, sin embargo su función y su origen evolutivo aún son inciertos. El gen *rtf* está presente únicamente en los genomas mitocondriales de las algas clorofíceas *C. reinhardtii* (Lang et al, 1997) y *C. smithii* (Kroymann y Zetsche 1998). Se ha sugerido que el gen *rtf* ha sido adquirido recientemente. Dicho gen se distingue por la presencia de codones que no son utilizados por otros genes que codifican proteínas en *C. reinhardtii* y por un bajo número de codones que terminan en T (Boer y Gray 1988). Los análisis que hemos realizado por BLAST indican que la proteína codificada por el gen *rtf* de *C. reinhardtii* (NP_042571) comparte un 72% de identidad con la transcriptasa reversa mitocondrial de *Chlamydomonas incerta* (ABC98218) y un 22% de identidad con la transcriptasa reversa del cloroplasto de *S. obliquus* (YP_636002). La transcriptasa reversa de *C. incerta* y *S. obliquus* comparten un 54% de identidad con respecto al sitio activo de la transcriptasa reversa de *C. reinhardtii*. El gen *rtf* no está presente en el genoma mitocondrial secuenciado de otras algas del género *Chlamydomonas*: *C. elongatum* ni *C. eugametos*. Se

cree que este gen fue adquirido solamente por las algas clorofíceas que pertenecen al mismo grupo que *C. reinhardtii* y *C. smithii* y que este grupo se generó después de la separación del linaje al que pertenecen *C. elongatum* y *C. eugametos* (Kroymann y Zetsche 1998).

Existe otro gen en *O. viridis*, que codifica el marco abierto de lectura 606 (YP_684407), que posiblemente codifica una transcriptasa reversa. Los análisis hechos por BLAST que hemos realizado indican que la proteína codificada por este gen comparte un 58% de identidad con la proteína mitocondrial codificada por el marco abierto de lectura 762 de la criptofita *Rhodomonas salina* (NP_066494) (Pombert et al, 2006), un 38% con una proteína codificada por un marco abierto de lectura localizado en un intrón en el gen *cox1* de la planta *Marchantia polymorpha* (YP_717185), un 36% de identidad con una transcriptasa reversa mitocondrial de *V. carterii* (ACD85984) y con una transcriptasa reversa mitocondrial del alga ectocarpal *Pylaiella littoralis* (NP_150406).

Transferencia de genes al núcleo

El dinamismo del genoma mitocondrial también afecta directamente al genoma nuclear. Distintos análisis de los genomas eucariontes indican que éstos se han originado mediante la combinación de transferencia vertical y horizontal de genes a partir de múltiples donadores (Hartman y Fedorov 2002, Andersson et al, 2003). Existen varias teorías para explicar el origen de los eucariontes y la adquisición de la mitocondria (Katz 2002). Todas se basan en procesos de endosimbiosis entre distintos organismos, donde el simbionte es una alfa-proteobacteria. Así, el organelo adquirido a través de un proceso endosimbiótico constituyó una fuente de material genético potencialmente transferible. La subsiguiente evolución de los genomas mitocondriales y nucleares resultó en una reducción gradual del genoma mitocondrial respecto al genoma del ancestro endosimbionte (Katz 2002). Como resultado de esta transferencia masiva de genes hubo genes del endosimbionte que no eran esenciales o que tenían una función redundante en el hospedero y fueron eliminados. Por otro lado, muchos genes fueron transferidos al genoma nuclear (Adams y Palmer 2003). La transferencia continua de DNA de la mitocondria al núcleo sugiere que todas las secuencias codificantes serán desplazadas eventualmente de la mitocondria. Sin embargo, la transferencia de genes no siempre es exitosa. En varias ocasiones los genes no se establecen de manera efectiva y funcional en el núcleo (Funes et al, 2002). En algunos organismos como los animales la transferencia de genes ha cesado, sin embargo en otros organismos como las plantas la transferencia de genes continúa (Timmis et al, 2004).

El proteoma actual de la mitocondria es un mosaico de proteínas. La mayoría de los componentes mitocondriales están codificados en el genoma nuclear; se calcula que aproximadamente más del 97% de las proteínas que utiliza la mitocondria son sintetizadas en el citoplasma e importadas post transcripcionalmente a la mitocondria (González-Halphen et al, 2003). Por tanto, muchas de las proteínas son retenidas en los organelos, pero no los genes que las codifican. Hay cinco genes de la cadena respiratoria que están presentes universalmente en el genoma mitocondrial, excepto cuando son funcionalmente innecesarios (como es el caso de la ausencia de los genes *nad* en los apicomplejos y en las levaduras que carecen del complejo I): *cob*, *nad1*, *nad4*, *nad5* y *cox1*. La característica principal de las proteínas codificadas por estos genes es que son sumamente hidrofóbicas y contienen varios cruces transmembranales (de 8 a 16) (Adams y Palmer 2003).

Los genomas mitocondriales de tipo reducido de las algas clorofíceas presentan un tamaño menor respecto a las demás algas verdes, así como un contenido reducido de genes. Un ejemplo de esto lo constituyen *C. eugametos* (Denovan-Wright et al, 1998), *C. elongatum* (Kroymann y Zetsche 1998), *P. parva* (Fan y Lee 2002), *P. capuana* (Smith y Lee 2008), *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.* (Pérez-Martínez et al, 2000, Pérez-Martínez et al, 2001 y Funes 2002) que carecen de los genes *nad3*, *nad4L*, *cox2*, *cox3*, *atp6* y *atp8*. En *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.* se ha demostrado que los genes *cox2* y *cox3* están codificados en el genoma nuclear (Pérez-Martínez et al, 2000 y Pérez-Martínez et al, 2001). Además, en *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.* el gen *cox2* presenta otra particularidad, éste se encuentra fragmentado en dos genes: *cox2a* (AAK30367 y AAK32115) y *cox2b* (AAK32117 y AAK32116) (Pérez-Martínez et al, 2001). Recientemente, la secuenciación y publicación en línea del genoma nuclear de otra alga clorofícea, *V. carteri* (http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1_home.html) nos ha permitido identificar que en esta alga el gen *cox2* también se encuentra fragmentado en los genes *cox2a* (estExt_Genewise1.C_170083) y *cox2b* (estExt_Genewise1Plus.C_100302) localizados en el genoma nuclear. También, en el alga clorofícea *S. obliquus* el gen *cox2* está fragmentado, pero el gen *cox2a* (NP_057974) se localiza en el genoma mitocondrial, mientras que el gen *cox2b* (AAO27881) se localiza en el genoma nuclear (Nedelcu et al, 2000 y Funes et al, 2002).

En otro tipo de algas que pertenecen al phylum *Phaeophyceae*, las algas caféas *P. littoralis* (NP_150411), *Laminaria digitata* (NP_659277), *Dismarestia viridis* (YP_448665) y *Fucus vesiculosus* (YP_448626), hemos observado mediante análisis *in silico* que el gen *cox2* mitocondrial contiene una inserción. Ésta se localiza en la misma posición en relación con la fragmentación del gen *cox2* ortodoxo en los genes *cox2a* y *cox2b*. Estudios futuros contribuirán a esclarecer si

la historia evolutiva de la inserción en el gen *cox2* mitocondrial de las algas cafés está relacionada con la fragmentación y relocalización del gen *cox2* mitocondrial de las algas verdes. Sorprendentemente, el gen *cox2* también se encuentra fragmentado en los apicomplejos. En nuestro grupo de trabajo se ha sugerido que los genes fragmentados *cox2a* y *cox2b* fueron adquiridos por transferencia horizontal a partir del genoma nuclear de las algas verdes, mediante una endosimbiosis secundaria entre los apicomplejos y las algas clorofíceas (Funes et al, 2002). Alternativamente, otros autores han propuesto que la fragmentación de los genes es un proceso que ocurrió de manera independiente en las algas verdes y en los apicomplejos (Waller y Keeling 2006).

El gen *cox2a* codifica un polipéptido que contiene dos cruces transmembranales y corresponde a la porción amino terminal de la proteína COXII ortodoxa y el gen *cox2b* codifica un polipéptido que corresponde a la porción carboxilo terminal de COXII. El modelo que se ha propuesto es que los polipéptidos interactúan entre sí para formar la proteína COXII funcional. Las proteínas codificadas por los genes *cox2a* y *cox2b* tienen características fisicoquímicas, como una menor hidrofobicidad, que les permite ser importadas a la mitocondria (Pérez-Martínez et al, 2001). Las modificaciones que han sufrido los genes que fueron transferidos al genoma nuclear y que les permiten ser completamente funcionales contribuyen a entender los procesos evolutivos involucrados en la transferencia de genes (Pérez-Martínez et al, 2000 y Funes et al, 2002).

Cuando un gen mitocondrial es transferido al genoma nuclear, experimenta cambios debido a las diferencias que existen en las maquinarias transcripcionales y traduccionales de la mitocondria y del núcleo y el citoplasma. Los cambios sufridos por el gen mitocondrial transferido conllevan a su correcta activación en el núcleo, e incluyen la adquisición de un promotor, una señal de poliadenilación y una secuencia que codifica para una señal de localización mitocondrial (Adams y Palmer 2003). Sin embargo, recientemente se ha sugerido en plantas que algunos genes mitocondriales transferidos al genoma nuclear, probablemente ya contienen la señal de localización mitocondrial antes de ser transferidos al genoma nuclear (Ueda et al, 2008).

La implacable transferencia de genes del genoma mitocondrial al nuclear contribuye a incrementar la complejidad del genoma nuclear (Adams y Palmer 2003). Otros genes que se han transferido del genoma mitocondrial al genoma nuclear en las algas verdes son aquellos que codifican distintas subunidades de la ATP sintasa mitocondrial. La ATP sintasa mitocondrial es un motor molecular constituido por un rotor compuesto por las subunidades γ , δ , ϵ y c_{10} que rotan sobre un eje perpendicular al plano de la membrana; un estator compuesto por las subunidades a, A6L, e, f, g,

b_2 , OSCP, F_0 y un centro catalítico que también es parte del estator y que está compuesto por tres subunidades α y tres subunidades β (Walker y Dickson 2006). El gen *atp9* que codifica la subunidad *c* de la ATP sintasa, normalmente se localiza en el genoma mitocondrial de las algas clorofíceas. Sin embargo, al analizar el contenido de los genomas mitocondriales publicados hemos observado que el gen *atp9* está ausente en los genomas mitocondriales de *P. minor*, *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.*. En las algas clorofíceas *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.* el gen *atp9* ha sido transferido al núcleo (Funes et al, 2002). Nuestros análisis bioinformáticos también localizan al gen *atp9* de *V. cartieri* en el genoma nuclear. Asimismo, los genes *atp6* y *atp8* que codifican las subunidades a y A6L del estator de la ATP sintasa, respectivamente, normalmente se localizan en el genoma mitocondrial de las algas clorofíceas. Sin embargo, el gen *atp6* está ausente en el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii*, *Polytomella sp.* (Funes et al, 2002) y *V. cartieri* (como lo indican las búsquedas que hemos realizado); y el gen *atp8* está ausente en el genoma mitocondrial de *C. reinhardtii*, *P. capuana* y *S. obliquus*. Asimismo, los análisis bioinformáticos hechos a partir de los genomas publicados en línea de *C. reinhardtii* y *V. cartieri*, indican que el gen *atp8* tampoco está presente en el genoma nuclear y probablemente desapareció en este linaje de algas.

La ausencia del gen *atp8* es notable, ya que estudios bioquímicos y bioinformáticos revelaron que la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas *C. reinhardtii* y *Polytomella sp.* contiene un estator formado por nueve subunidades novedosas. Estas subunidades han sido denominadas ASA por las siglas en inglés para «proteínas asociadas a la ATP sintasa» y que van de ASA 1 hasta ASA 9 (Vázquez-Acevedo et al, 2006). Actualmente, mediante análisis hechos por BLAST hemos encontrado homólogos de las subunidades ASA 2 a 9 en *P. parva*, ASA 5 a 7 y 9 en *C. incarta* y ASA 4, 5, 7 y 9 en *S. obliquus*. Esto sugiere que las proteínas ASA están asociadas exclusivamente con las ATP sintasas mitocondriales de las algas clorofíceas. Será muy interesante en un futuro realizar estudios de las subunidades ASA para conocer su origen, determinar si están presentes en otras algas que no sean clorofíceas y conocer qué características bioquímicas y funcionales confieren a la ATP sintasa mitocondrial. Estos estudios permitirán conocer si existen algas clorofíceas cuyo estator esté constituido tanto por subunidades clásicas como por subunidades ASA y que por lo tanto pudieran representar intermediarios evolutivos dentro del linaje de las clorofíceas. Asimismo, estos estudios también contribuirán a dilucidar si los eventos que condujeron a la reducción del genoma mitocondrial de las algas verdes y a la pérdida de los genes que codifican las distintas subunidades del estator tradicional, están relacionadas con la adquisición de las subunidades novedosas ASA.

IMPLICACIONES DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN LA FILOGENIA DE ALGAS CLOROFÍCEAS

Las propiedades de los genomas tales como estructura, composición, organización, contenido de genes, de intrones y número de copias de genes pueden ser una herramienta útil y alternativa para estudiar y establecer las relaciones filogenéticas que existen entre organismos, ya que evitan algunas dificultades de la filogenia molecular clásica. Normalmente, las inferencias evolutivas están basadas en las secuencias de genes, tales como rRNA pequeños (16S) que son considerados marcadores filogenéticos fidedignos por ser moléculas muy abundantes, por estar universalmente conservadas y por tener una tasa de sustituciones de nucleótidos parecida. Las fuerzas evolutivas son multidimensionales, por lo que el análisis de un solo gen puede ser insuficiente para entender completamente la divergencia entre distintas formas de vida.

La filogenia de las algas verdes está en constante revisión (Margulis y Schwartz 1998). Anteriormente, la clasificación estaba basada exclusivamente en aspectos morfológicos. Esta clasificación no es muy confiable ya que hay algas que contienen caracteres morfológicos representativos de más de un grupo (Lewis y McCourt 2004). La creciente información acerca de los genomas de las algas verdes ha ido modificando y expandiendo la visión de su filogenia. Los nuevos datos moleculares han permitido obtener clasificaciones más confiables que han asignado correctamente algas verdes que habían sido difíciles de clasificar basándose solamente en aspectos morfológicos. Sin embargo, aún existen diferencias notables entre las clasificaciones basadas en aspectos morfológicos y aquellas basadas en aspectos moleculares (Lewis y McCourt 2004).

La clasificación filogenética de las algas clorofíceas más reciente es la de Pröschold et al, que está basada en características morfológicas y en secuencias nucleares de rRNA (Pröschold 2001). Pröschold et al, han descrito 18 linajes monofiléticos o clados: *Stephanosphaera*, *Chlorogonium*, *Polytoma*, *Dunaliella*, *Monadina*, *Phacotus*, *Moewusii*, *Radiosa*, *Oogamochlamys*, *Chloromonas*, *Reinhardtii*, *Chaetophora*, *Oedogonium*, *Chaetopeltris*, *Neochloris*, *Hydrodictyon*, *Scenedesmus*, *Bracteacoccus*. Los primeros 11 clados conforman un subgrupo que se caracteriza por tener un cuerpo basal del flagelo que se desplaza en dirección opuesta a las manecillas del reloj.

Nosotros proponemos que en el linaje de las algas clorofíceas, ocurrieron cambios evolutivos que probablemente sucedieron una sola vez y que dieron lugar a una mayor reducción del genoma mitocondrial respecto a los otros grupos de algas verdes. Esto se debió a una transferencia de genes mitocondriales al núcleo, entre los cuales se encuentran los genes que codifican subunidades de la citocromo *c*

oxidasa y de la ATP sintasa. Por una parte, esta transferencia dio origen a los genes fragmentados *cox2a* y *cox2b* en el genoma nuclear del linaje de algas clorofíceas. Por otra parte, los genes *atp* que codifican las distintas subunidades del estator clásico de la ATP sintasa mitocondrial desaparecieron del genoma mitocondrial y surgieron en el genoma nuclear genes que codifican las subunidades novedosas de la ATP sintasa mitocondrial (subunidades ASA 1-9). De esta manera, basándonos exclusivamente en la transferencia de genes al genoma nuclear y en la ausencia de genes en el genoma mitocondrial, la presencia de los genes fragmentados que codifican la subunidad COXII y los genes que codifican las subunidades ASA del estator de la ATP sintasa mitocondrial en el genoma nuclear y su correspondiente ausencia del genoma mitocondrial, podría servir como un marcador genético para resolver controversias en el linaje de las algas clorofíceas. En otras palabras, nosotros hipotetizamos que la presencia de subunidades COXII fragmentadas en la citocromo *c* oxidasa y de subunidades ASA en la ATP sintasa mitocondrial, pueden ser marcadores exclusivos de las algas clorofíceas.

Hasta ahora no se ha encontrado ninguna propiedad genómica que por sí sola pueda representar un marcador filogenético confiable, por lo que la integración de la información de diferentes propiedades genómicas es deseable (Tamames 2001). Se espera que en el futuro la creciente información acerca del genoma de las algas verdes así como el uso combinado de distintas características de los genomas nucleares y mitocondriales contribuya a obtener una visión más completa de la filogenia de algas verdes que permita dilucidar las relaciones entre las algas del linaje de las clorofíceas.

CONCLUSIONES

El conocer los principales eventos en la evolución de los eucariontes es un reto difícil en el estudio de la evolución, principalmente porque los eventos son muy antiguos e imposibles de comprobar. El origen endosimbiótico de la mitocondria ha constituido una fuente importante de material genético que ha contribuido a incrementar la complejidad genética del hospedero (Hartman y Fedorov 2002 y Andersson et al, 2003). La adquisición de un genoma o fragmentos de un genoma provee a un organismo de nuevas posibilidades para cambiar drásticamente sin perder su coherencia y viabilidad. Así, la innovación en la evolución de los genomas mitocondriales no depende solamente de la acumulación de mutaciones o duplicaciones (Margulis y Sagan 2003).

Los genomas mitocondriales presentan características que los hacen muy efectivos en la reconstrucción de relaciones filogenéticas. La primera, es que son heredados de manera uniparental, por lo que no hay recombinación de

los genomas maternos y paternos. La segunda, es la presencia de caracteres que resultan de eventos moleculares raros que probablemente hayan ocurrido solamente una vez a lo largo de la evolución, tales como el rearrreglo, la presencia o la ausencia de genes. Dadas estas características, se puede comprobar un dinamismo entre el genoma nuclear y el genoma mitocondrial de las algas verdes a lo largo de su historia evolutiva que permite utilizar características de ambos genomas para establecer relaciones filogenéticas en las algas verdes. Proponemos que la fragmentación del gen *cox2* y la adquisición de subunidades ASA por el genoma nuclear pueden constituir un marcador genético exclusivo del linaje de las algas clorofíceas. En otras palabras, nuestra hipótesis es que aquellas algas verdes que contienen el gen *cox2* fragmentado, también tienen una ATP sintasa con subunidades ASA.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Xóchitl Pérez-Martínez (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y al Dr. Roberto Hernández Fernández (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por la discusión, las sugerencias y los comentarios al manuscrito. Este trabajo ha sido apoyado por el donativo 56619 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) y por el donativo IN217108 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. E.R.S. realiza sus estudios en el Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas (UNAM) y es becaria del CONACYT (203465).

REFERENCIAS

- Adams KL, & J. D. Palmer. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol.* 29: 380-395.
- Anderson, SGO, Karlberg, B. Cambäck & CG. Kurland. 2003. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358: 165-179.
- Babushok, D. V., E. M. Ostretskiy & H. H. Jr. Kazanin. 2007. Current topics in genome evolution: molecular mechanisms of new gene formation. *Cell Mol Life Sci.* 64: 542-554.
- Barr, C. M., M. Neiman & D. R. Taylor. 2005. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol.* 168(1):39-50.
- Boer, P. H. & M. W. Gray. 1988. Genes encoding a subunit of respiratory NADH dehydrogenase (ND1) and a reverse transcriptase-like protein (RTL) are linked to ribosomal RNA gene pieces in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. *EMBO J.* 7: 3501-3508.
- Brown, W. M., M. Jr. George & A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76: 1967-1971.
- Bullerwell, D. E. & M. W. Gray. 2004. Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol.* 7: 328-334.
- Burgar, G., M. W. Gray & B. F. Lang. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* 19(12):709-16.
- Conway, D. J., C. Fanello, J. M. Lloyd, B. M. Al-Joubori, A. H. Baloch, S. D. Somanath, C. Roper, A. M. Oduola, B. Mulder, M. M. Povea, B. Singh & A. W. Thomas. 2000. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol.* 111: 163-171.
- Demovon-Wright, E. M., A. M. Nedelcu & R. W. Lee. 1998. Complete sequence of the mitochondrial DNA of *Chlamydomonas eugametos*. *Plant Mol Biol.* 36: 285-295.
- Diackmann, C. L. & B. Gandy. 1987. Preferential recombination between GC clusters in yeast mitochondrial DNA. *EMBO J.* 6: 4197-4203.
- Fan, J. & R. W. Lee. 2002. Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella parva*: two linear DNA molecules with homologous inverted repeat termini. *Mol Biol Evol.* 19: 999-1007.
- Fauron, C. M., C. Caspar, Y. Gao & B. Moore. 1995. The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional. *Trends Genet.* 11: 228-235.
- Fedorova, L. & A. Fedorov. 2003. Introns in gene evolution. *Genetica.* 118: 123-131.
- Funes, S., E. Davidson, A. Reyes-Prieto, S. Magallon, P. Herion, M. P. King & D. Gonzalez-Halphen. 2002. A green algal apicoplast ancestor. *Science.* 298: 2155.
- Funes, S., E. Davidson, M. G. Claros, R. van Lis, X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, M. P. King & D. Gonzalez-Halphen. 2002. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 277: 6051-6058.
- Funes, S., X. Pérez-Martínez, A. Antamarian, M. Vázquez-Acevedo, R. van Lis, A. Reyes-Prieto, J. I. Santillan-Torres, M. G. Claros, E. Davidson, M. P. King & D. Gonzalez-Halphen. 2002. Transfer of Mitochondrial Genes to the Nucleus in *Chlamydomonas* Algae: Perspectives for the Allotopic Expression of OX-PHOS Proteins and Future Human therapies. pp. 173-194. *Recent Research Developments in bioenergetics.* Research Signpost, India.
- Gonzalez-Halphen, D., X. Pérez-Martínez, S. Funes, A. Reyes-Prieto & J. I. Santillan-Torres. 2003. La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. *Mensaje Bioquímico.* Vol. XXVII: 201-220.
- Gray, M. W., B. F. Lang, R. Cedergren, G. B. Golding, C. Lemieux, D. Sankoff, M. Turmel, N. Brossard, E. Delage, T. G. Littlejohn, I. Plante, P. Rioux, D. Saint-Louis, Y. Zhu & G. Burgar. 1998. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res.* 26: 865-878.
- Gray, M. W., G. Burgar & B. F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. *Science.* 283: 1476-1481.
- Gray, M. W., G. Burgar & B. F. Lang. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* 2: 1018.1-1018.5.
- Hartman, H. & A. Fedorov. 2002. The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 1420-1425.
- Hansen, P., D. M. Simon & D. Bhattacharya. 2005. The natural history of group I introns. *Trends Genet.* 21(2):111-9.
- Katz, L. A. 2002. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 1893-1900.
- Knight, R. D., L. F. Landweber & M. Yarus. 2001. How mitochondria redefined the code. *J Mol Evol.* 53(4-5):299-313.
- Kroymann, J. & K. Zetsche. 1998. The mitochondrial genome of *Chlorogonium elongatum* inferred from the complete sequence. *J Mol Evol.* 47: 431-440.
- Lang, B. F., G. Burgar, C. J. O'Kelly, R. Cedergren, G. B. Golding, C. Lemieux, D. Sankoff, M. Turmel & M. W. Gray. 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a subbacterial genome in miniature. *Nature.* 387: 493-497.
- Lewis, L. A. & R. M. McCourt. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot.* 91: 1535-1556.
- Logan, D. C. 2007. The mitochondrial compartment. *J Exp Bot.* 58: 1225-1243.
- Louis, E. J. 2007. Evolutionary genetics: making the most of redundancy. *Nature.* 449: 677-681.

31. Margulis L. 1975. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol.* (29):21-38.
32. Margulis, L. & D. Sagan. 2003. *Acquiring Genomes: A Theory of the Origins of Species.* pp. 201-205 Basic Books USA.
33. Margulis, L. & K.V. Schwartz. 1998. *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth.* pp. 192-193. 3rd ed. W. H. Freeman and company. N.Y.
34. Meentel, M. & W. Martin. 2008. Energy metabolism among eukaryotic anaerobes in light of Proterozoic ocean chemistry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363(1504):2717-29.
35. Morris, J. C., M. E. Drew, M. M. Klingbeil, S. A. Motyka, T. T. Saxowsky, Z. Wang & P. T. Englund. 2001. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int J Parasitol.* 31: 453-458.
36. Mühlenhoff, U. & R. Lill. 2000. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1459: 370-382.
37. Nedelcu, A. M. & R. W. Lee. 1998. Short repetitive sequences in green algal mitochondrial genomes: potential roles in mitochondrial genome evolution. *Mol Biol Evol.* 15: 690-701.
38. Nedelcu, A. M., R. W. Lee, Lemieux C, Gray MW & G. Burger. 2000. The complete mitochondrial DNA sequence of *Scenedesmus obliquus* reflects an intermediate stage in the evolution of the green algal mitochondrial genome. *Genome Res.* 10: 819-831.
39. Pérez-Martínez, X., A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, S. Funes, E. Tolkunova, J. d'Alayur, M. G. Claros, E. Davidson, M. P. King & D. González-Halphen. 2001. Subunit II of cytochrome c oxidase in *Chlamydomonas* algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem.* 276: 11302-11309.
40. Pérez-Martínez, X., M. Vázquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M. G. Claros, E. Davidson, M. P. King & D. González-Halphen. 2000. Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of *Chlamydomonas* algae. *J Biol Chem.* 275: 30144-30152.
41. Pombert, J. F., C. Otis, C. Lemieux & M. Turmel. 2004. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Pseudococlonium akinetum* (Ulvoophyceae) highlights distinctive evolutionary trends in the chlorophyta and suggests a sister-group relationship between the Ulvoophyceae and Chlorophyceae. *Mol Biol Evol.* 21: 922-935.
42. Pombert, J. F., P. Beauchamp, C. Otis, C. Lemieux & M. Turmel. 2006. The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Oltmansiallopsis viridis*: evolutionary trends of the mitochondrial genome in the Ulvoophyceae. *Curr Genet.* 50: 137-147.
43. Post-Kinoshita, G., N. A. Okada, J. L. Macfarlane, C. T. Beagley, C. D. Watkins-Sims, T. Cavalier-Smith, G. D. Clark-Walker & D. R. Wolstenholme. 1998. Mitochondrial DNA of the coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondrion. *J Mol Evol.* 46: 419-431.
44. Poole, A. M. & D. Penny. 2007. Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *Bioessays.* 29: 74-84.
45. Protschold T, B. Marin, U. G. Schlösser & M. Melkonian. 2001. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist.* 152: 265-300.
46. Robbins, S., E. Derelle, C. Ferraz, J. Wuyts, H. Morvan & Y. Van de Peer. 2007. The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Mol Biol Evol.* 24: 956-968.
47. Saccone, C., C. Lanave & A. De Grassi. 2006. Metazoan OXPHOS gene families: evolutionary forces at the level of mitochondrial and nuclear genomes. *Biochim Biophys Acta.* 1757: 1171-1178.
48. Salinas, T., A. M. Duchêne & L. Marechal-Drouard. 2008. Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci.* 33: 320-329.
49. Schmidt, E. E. & C. J. Davies. 2007. The origins of polypeptide domains. *Bioessays.* 29: 262-270.
50. Smith, D. R. & R. W. Lee. 2008. Mitochondrial genome of the colorless green alga *Polytomella capuana*: a linear molecule with an unprecedented GC content. *Mol Biol Evol.* 25: 487-496.
51. Sugino, R. P. & H. Innan. 2006. Selection for more of the same product as a force to enhance concerted evolution of duplicated genes. *Trends Genet.* 22(12):642-4.
52. Tamames, J. 2001. Evolution of gene order conservation in prokaryotes. *Genome Biol.* 2: 20.1-20.11.
53. Terasawa, K., M. Odahara, Y. Kabeya, T. Kikugawa, Y. Sekino, M. Fujiwara & N. Sato. 2007. The mitochondrial genome of the moss *Physcomitrella patens* sheds new light on mitochondrial evolution in land plants. *Mol Biol Evol.* 24: 699-709.
54. Timmis, J. N., M. A. Ayliffe, C. Y. Huang & W. Martin. 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet.* 5: 123-135.
55. Turmel, M., C. Lemieux, G. Burger, B. F. Lang, C. Otis, I. Plants & M. W. Gray. 1999. The complete mitochondrial DNA sequences of *Nephroselmis olivacea* and *Pedinomonas minor*. Two radically different evolutionary patterns within green algae. *Plant Cell.* 11: 1717-1730.
56. Ueda, M., M. Fujimoto, S. I. Arimura, N. Tsutsumi & K. I. Kadowaki. 2008. Presence of a latent mitochondrial targeting signal in gene on mitochondrial genome. *Mol Biol Evol.* 25(9):1791-1793.
57. Valronholz, C., G. Riamen, E. Pratsje, B. Dujon & G. Michaelis. 1993. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr Genet.* 24(3):241-7.
58. van Lis, R., D. González-Halphen & A. Atsita. 2005. Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta.* 1708(1):23-34.
59. Vázquez-Acevedo, M., P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaila, C. Remacle & D. González-Halphen. 2006. The mitochondrial ATP synthase of chlorophyte algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomembr.* 38: 271-282.
60. Walker, J. E. & V. K. Dickson. 2006. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1757(5-6):286-96.
61. Waller, R. F. & P. J. Keeling. 2006. Alveolate and chlorophyte mitochondrial *cox2* genes split twice independently. *Genes.* 383: 33-37.
62. Wolff, G., I. Plants, B. F. Lang, U. Köck & G. Burger. 1994. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii*. Gene content and genome organization. *J Mol Biol.* 237: 75-86.

Correspondencia:

Diego González Halphen
 Departamento de Genética Molecular,
 Instituto de Fisiología Celular,
 Universidad Nacional Autónoma de México,
 Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria,
 Coyoacán, México, D.F. 04510, México.
 Teléfono: +52-55-5622-56-20,
 Fax: +52-55-5622-56-11
 E-mail: dhalphen@ifc.unam.mx