

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CÍCERO ALVES LIMA JUNIOR

**Relógio circadiano em eucariotos fotossintetizantes
(Archaeplastida) e adaptação ao estresse**

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 5890
A original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na SPG
9/01/2018

CÍCERO ALVES LIMA JUNIOR

**Relógio circadiano em eucariotos fotossintetizantes
(Archaeplastida) e adaptação ao estresse**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta
Co-Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A474r	Alves-Lima, Cicero	Relógio circadiano em eucariotos fotossintetizantes (Archaeplastida) e adaptação ao estresse / Cicero Alves-Lima. - São Paulo, 2018. 160 p.
	Tese (doutorado) - Instituto de Química da	Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
	Orientador:	Hotta, Carlos Takeshi
	Coorientador:	Colepicolo, Pio
	1. Relógio Circadiano. 2. Estresse. 3. Gracilaria. 4. Ostreococcus. 5. Saccharum. I. T.	
	II. Hotta, Carlos Takeshi, orientador. III.	
	Colepicolo, Pio, coorientador.	

Dedico esta Tese às minhas irmãs, Isa e Laís.

AGRADECIMENTOS

A Carlos Hotta pela amizade, orientação de altíssima qualidade, ensinamentos científicos e pessoais e motivação constante.

A Pio Colepicolo pela amizade, orientação, disponibilidade, liberdade e confiança.

A Prof^a Glaucia Mendes pela confiança e disponibilidade de sua incrível infraestrutura e pessoal.

À François-Yves pelo acolhimento internacional e disponibilidade.

A Rafael Ribeiro e Eduardo Caruso do IAC pela disponibilidade da infraestrutura, confiança e ensinamentos para os experimentos com cana-de-açúcar.

Às professoras Dr^a Nair Yokoya e Mariana Cabral pelo fornecimento das linhagens de Gracilaria e discussões gerais sobre biologia e evolução de algas.

Aos meus familiares Cícero, Eurídice, João Carlos, Luci, Saboia (in memoriam), Vitória, Celso, Samuel e Cardoso pelos conselhos e carinho.

À Mariana Takeda por seu amor, carinho e paciência

A todos os 26 membros passageiros da república 83B e do Instituto de Química pelo intenso aprendizado sobre convivência diária com diferenças.

Aos amigos e colegas dos laboratórios de Algas e de Cana do Instituto de Química da USP pela convivência científica e pessoal.

A todos amigos que fiz no Laboratoire Arago em Banyuls-sur-mer na França.

À Severino, Neidiquele e Fernanda pela ajuda excepcional nos experimentos com cana-de-açúcar no IAC em Campinas.

Às agências financiadoras FAPESP (processos 2013/05301-9 e 2016/20040-5), CNPq, CAPES e MCTI por me fornecerem bolsas e financiamento.

**Ronca o céu, treme a terra, abala o norte
Se esparrama uma sombra sobre o sul
São o sonho e a noite irmãos da morte?
Só sobrou nós dois num manto azul
- Siba, 2012**

**Um grito de estrela vem do infinito
E um bando de luz repete o grito
Todas as cores e outras mais
Procriam flores astrais
Um verme passeia na lua cheia
— Secos e Molhados, 1974**

**Abacateiro teu recolhimento é justamente
O significado da palavra temporão
Enquanto o tempo não trazer teu abacate
Amanhecerá tomate
E anoitecerá mamão
- Gilberto Gil, 1975**

RESUMO

(Alves-Lima, C). **Relógio circadiano em eucariotos fotossintetizantes (Archaeplastida) e adaptação ao estresse**. 2018. 160p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Relógios endógenos controlam grande parte de processos biológicos através de osciladores bioquímicos que coordenam a sinalização de pistas ambientais até vias metabólicas, permitindo a percepção do tempo e adaptação a mudanças rítmicas. Comportamentos cíclicos diários foram primordialmente descritos em plantas e, mais recentemente, têm fornecido informações valiosas sobre os ciclos de retroalimentação da transcrição e tradução de genes que controlam estes osciladores. O florescimento é um exemplo bem conhecido da importância da percepção do comprimento do dia através do relógio, processo intimamente regulado por fotorreceptores e pelos genes centrais e periféricos do relógio biológico. Em organismos multicelulares há uma combinação específica de genes mais expressa em cada tecido, podendo ter funções, fases e períodos diferentes, o que aumenta a complexidade desse mecanismo. Devido a isso, tem-se buscado modelos alternativos mais simples dentro dos eucariotos fotossintetizantes relacionados às plantas terrestres. Modelos simplificados facilitam, por exemplo, a avaliação da combinação de fatores que induzem o estresse e como o relógio biológico se altera, permitindo a antecipação de mudanças ambientais e sincronização da fisiologia com o meio ambiente. Neste trabalho, verificou-se como o relógio circadiano se ajusta ao estresse em 3 diferentes modelos: *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta), *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta) e *Saccharum sp* (Embryophyta). Para isso, estabeleceu-se em *G. tenuistipitata* métodos para avaliação de crescimento e da fluorescência da clorofila de modo automático, comprovando da existência de ritmos circadianos. Além disso, após padronização de genes de referência para normalização das RT-qPCRs, o gene *TRX* ficou superexpresso durante a primeira hora após o déficit hídrico. Já em *O. tauri*, onde os genes centrais do relógio são conhecidos, mudanças na expressão de *LOV-HK* e *TOC1* estão relacionadas com maior crescimento em baixa e alta temperatura, respectivamente. Uma combinação específica de luz, temperatura e salinidade pode ser um importante indutor de eflorações que reflete mudanças transcricionais no oscilador central, o que pode ser comparado às florescências de plantas terrestres. Já em *Saccharum sp* tolerante à seca, ritmos de fotossíntese e de expressão de *CCA1* sofrem mudanças de fase em suas oscilações e transcritos de *HVA-22* e *DRP* são significativamente mais expressos sob dessecação. Em suma, o estresse em *Saccharum sp* reseta o relógio, aumentando o período de oscilação da fotossíntese. Em *O. tauri* induz maior crescimento, mantendo as características do relógio. Não foi possível avaliar o efeito do estresse no relógio de *G. tenuistipitata*, mas ferramentas foram desenvolvidas visando este objetivo. Estudos de respostas do relógio podem fornecer informações valiosas para o entendimento da reprodução e crescimento de organismos com elevado potencial de aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Archaeplastida; Gracilaria, *Ostreococcus*, *Saccharum*, Relógio Circadiano, Estresse.

ABSTRACT

(Alves-Lima, C). **Circadian clock in photosynthetic eukaryotes (Archaeplastida) and stress adaptation.** 2018. 160p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Endogenous clocks control a large range of biological processes through biochemical oscillators that coordinate the signaling of environmental cues to metabolic pathways, allowing the perception of time and adjust to rhythmic changes. Cyclical daily behaviors were first noticed in plants and, more recently, revealed information about the transcriptional-translational feedback loops of genes that control these oscillators. Flowering is a well-known process where the perception of day length by the clock is intimately regulated by photoreceptors and by the central and peripheral genes of the biological clock. Multicellular organisms have a tissue-specific combination of expressed clock genes that may have different phase and period, increasing the complexity of this mechanism. Due to this reason, alternative models have been proposed for land plants-related photosynthetic eukaryotes. New models can simplify, for example, which combination of factors induce stress and how the biological clock is altered, allowing the anticipation of environmental changes and synchronization of physiology and environmental factors. This work aimed to verify how the biological clock adjusts to different kinds of stresses in 3 species: *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta), *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta) and *Saccharum sp* (Embryophyta). Automated measurement techniques for growth rate and photosynthesis were established for the red alga. This alga also showed, after establishment of reference genes for RT-qPCRs normalization, an overexpression of TRX during the first hour under water deficit. In *O. tauri*, where the central clock genes are known, changes in LOV-HK and TOC1 gene expression are related to a higher growth rate under low and high temperatures, respectively. Besides, a specific combination of light, temperature and salinity can be an important trigger of seasonal blooms that causes important transcriptional changes at the central oscillator, what is similar to land plants. In *Saccharum sp* tolerant to drought, photosynthesis rhythms and CCA1 expression change their phase under simulated water deficit and drought responsive transcripts like HVA-22 and DRP are significantly up-regulated. In short, stress resets the clock in *Saccharum sp*, increasing the period of photosynthesis oscillation. In *O. tauri*, it induces a higher growth, keeping clock features. It was not possible to verify clock responses to stress in *G. tenuistipitata*, but methods to do so were established. The biological clock responses to stress can provide invaluable information for the better understanding about the growth and reproduction of organisms with a high biotechnological potential.

Keywords: Archaeplastida; *Gracilaria*, *Ostreococcus*, *Saccharum*, Circadian clock, Stress

LISTA DE SIGLAS

ACT1 – Actina 1
ASW – Artificial seawater
ATP5B – ATP synthase subunit B
CCA1- Circadian Clock Associated 1
cDNA – Ácido desorribonucléico complementar
CO – gene CONSTANS
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
CRY – gene Cryptochrome
C_t – Cycle Threshold
CTRL – Amostras controle
DEPC – Dietilpirocarbonato
DLI – Daily Light Input
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DRP – gene Desiccation-related protein PCC13-62
DTT - Ditioneitol
EE – Domínio Evening Element
EEF2 – gene Eukaryotic translation elongation factor 2
EF-1 α – gene Elongation Factor 1 alfa
EST – Expressed sequence tags
FAO – Food and Agriculture organization
FFT-NLLS - Fast Fourier Transforms – Non Linear least Squares
G6PD – gene Glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase
GAPDH – gene Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
GI – gene Gigantea
GLB – gene beta-galactosidase
GTF2B – gene Transcription elongation factor IIB
IAC – Instituto agronômico de Campinas
IRGA - Infrared Gas Analyser
Lhcb – gene Light Harvesting Complex B
LHY - gene Late Elongated Hypocotyl
LIP5 – gene LYST-interacting protein 5
LOV-HK – gene Light, Oxygen, or Voltage sensing - containing Histidine Kinase
LOVko – linhagem com gene LOV-HK *knocked down*
MYB – Domínio semelhante ao protooncogene myb
NIA2 – gene nitrate reductase
OEE1 – gene plastid oxygen evolving enhancer 1
OTUs – Operational taxonomic unit
PAR – Photosynthetic Active Radiance
PCR – Polymerase Chain Reaction
PEG – Polietileno glicol
PHY – gene phytochrome
PP2C – gene protein phosphatase 2C
PPFD – Photosynthetic photon flow density
PRR – pseudo response regulator
RAE – Relative amplitude error
RCC - Roscoff Culture Collection
REC – Receiver domain
Rhod-HK – gene Rhodopsin histidine kinase
RLP17 – gene 60S ribosomal protein L17

RNA – Ácido ribonucleico
RPM – Rotações por minuto
RR – Domínio proteico Response regulator
RT-qPCR – Reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction
SOLA - SOMLIT Observatory Laboratoire Arago – Banyuls, France
TC – Taxa de clorose
TCRD – Taxa de Crescimento Relativo Diária
TD – Taxa de desidratação
TOC1 – gene Time of CAB expression.
TOC1-ko – linhagem com gene TOC1 *knocked down*
TOC1-ox – linhagem com gene TOC1 superexpresso
TRX – gene thioredoxin
TSS - Tris-Sarkosyl-saline
TUB – gene b-tubulin
Tukey-HSD – Teste tukey – Honest Significant difference
UNICA – União das indústrias de cana-de-açúcar
WT – linhagem wild type (selvagem)

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. HIPÓTESE	24
3. REFERENCIAS	25
4. CAPÍTULO 1 – Relógio biológico e tolerância ao déficit hídrico em <i>Gracilaria tenuistipitata</i> (Rhodophyta, Florideophyceae)	34
5. INTRODUÇÃO	35
6. HIPÓTESE	38
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
8. RESULTADOS	46
9. DISCUSSÃO	61
10. CONCLUSÃO.....	69
11. REFERENCIAS	70
12. CAPÍTULO 2 – Interação de fatores abióticos e relógio biológico no crescimento de <i>Ostreococcus tauri</i> (Chlorophyta, Prasinophyceae)	80
13. INTRODUÇÃO	81
14. HIPÓTESE	85
15. MATERIAIS E MÉTODOS.....	86
16. RESULTADOS	90
17. DISCUSSÃO	104
18. CONCLUSÃO.....	107
19. REFERÊNCIAS.....	108
20. CAPÍTULO 3 – Genes do relógio de <i>Saccharum sp</i> (Embryophyta, Poaceae) estão relacionados a mudanças na fotossíntese sob déficit hídrico	113
21. INTRODUÇÃO	114
22. HIPÓTESE	118
23. MATERIAIS E MÉTODOS.....	119

24. RESULTADOS	126
25. DISCUSSÃO	134
26. CONCLUSÃO	140
27. REFERÊNCIAS	141
28. DISCUSSÃO GERAL	146
29. CONCLUSÕES GERAIS	150
30. REFERENCIAS	152
SÚMULA CURRICULAR	161

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Relógio biológico em eucariotos fotossintetizantes

Relógios biológicos controlam diversos processos biológicos em grande parte dos organismos vivos. A capacidade de medir o tempo de forma endógena permite antecipação de mudanças ambientais, o preparo de respostas específicas para cada perturbação, além de sincronização temporal e espacial de vias metabólicas e desenvolvimento. (BELL-PEDERSEN et al., 2005; DODD et al., 2005; DUNLAP; LOROS, 2016; GARDNER et al., 2006; HARMER, 2009; WOELFLE et al., 2004). O relógio biológico está em constante adaptação para melhorar o desempenho e produtividade de acordo com as mudanças ambientais, resultando em sensíveis mudanças de fase e/ou de periodicidade (DUNLAP, 1999; LÜNING, 1994; PITTENDRIGH; TAKAMURA, 1987).

Os relógios biológicos com períodos de 24h, chamados circadianos (do latim circa – “em torno de” + dien – “dia”), foram selecionados evolutivamente devido a um ganho de fitness dos organismos que estavam cada vez mais sincronizados com o movimento de rotação da Terra. As plantas, por exemplo, ao longo de milhões de anos desenvolveram mecanismos moleculares que as permitiam sincronizar seus ciclos fisiológicos com as alterações de claro e escuro, além de permitir sua previsibilidade. Para tanto, genes que se autorregulam de forma cíclica surgiram: CCA1/LHY (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1/LATE ELONGATED HYPOCOTYL) e TOC1 (TIME OF CAB EXPRESSION 1) (HARMER, 2009; KEHOE et al., 1994; KENIGSBUCH; TOBIN, 1995; MILLAR et al., 1995; WANG et al., 1997). CCA1/LHY e TOC1 são fatores de transcrição que possuem domínios específicos de ligação ao

DNA em regiões promotoras dos genes em que promovem a repressão (CARRÉ; KIM, 2002; GOLDEN; STRAYER, 2001).

Este complexa via de sinalização de repressão foi descrita como um ciclo de retroalimentação da transcrição e da tradução (transcription-translation feedback loops – TTFLs), descrito inicialmente em *Drosophila* (HARDIN et al., 1990). Estudos posteriores encontraram este tipo de regulação em todos grupos de organismos vivos, desde mamíferos até cianobactérias, porém com ausência de homologia em seus componentes centrais, o que sugere um surgimento independente do relógio (YOUNG; KAY, 2001)

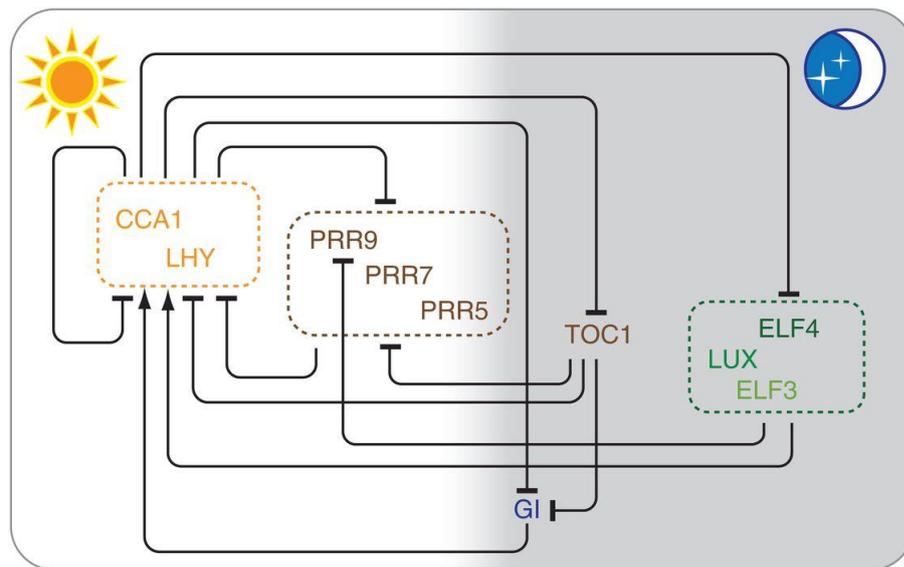


Figura 1. Arquitetura mínima do relógio circadiano de *Arabidopsis thaliana*. São mostrados apenas os genes principais do ciclo de retroalimentação da transcrição e da tradução. Os genes são mostrados da esquerda para a direita de acordo com a hora do dia do máximo de expressão de cada gene. Planos de fundo branco e cinza demonstram dia e noite, respectivamente. CCA1/LHY são expressos no começo da manhã e reprimem a expressão de todos os outros componentes. O Evening Complex (EC) é composto pelos genes em verde que induzem a transcrição de LHY/CCA1 e reprimem os genes PRR em marrom. As linhas com barra indicam repressão e as linhas com setas indicam ativação da transcrição. Adaptado de SANCHEZ; KAY, 2016.

Em *Arabidopsis*, os genes CCA1 e LHY tem função redundante e formam um homodímero (LU et al., 2009; MIZOGUCHI et al., 2002), apresentando quantidade de transcritos máxima no amanhecer que decai ao longo do dia, atingindo mínimo no

começo da noite (GREEN; TOBIN, 2002). Além disso, é traduzido em um fator de transcrição que se liga em motivos EE (Evening Element), regulando a transcrição de genes pertencentes a outras vias de sinalização, como LHCB (LIGHT HARVESTING CHLOROPHYLL A/B BINDING) integrante do fotossistema II ou ERD7 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7), ligado ao estresse de seca (NAGEL et al., 2015; WANG et al., 1997) e de genes da própria via, como TOC1 (Figura 1). Este último apresenta pico de expressão no anoitecer, sendo traduzido em um fator de transcrição que se liga ao promotor de CCA1 em um sítio de ligação TCP (TB1, CYC e PCF1) do bHLH em seu promotor, inibindo sua transcrição (GENDRON et al., 2012; LI, 2015; MILLAR et al., 1995; PRUNEDA-PAZ et al., 2009). Esses genes também podem se ligar a regiões promotoras de genes pertencentes a diversas outras vias de sinalização como produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e modificações epigenéticas (HEMMES et al., 2012; LAI et al., 2012), regulando respostas transcricionais de adaptação ao estresse, como frio e seca, além de promover também o florescimento (ALABADÍ et al., 2001; FARRÉ; LIU, 2013; FUJIWARA et al., 2008; MIKKELSEN; THOMASHOW, 2009).

Os genes PRR9 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR), PRR7 e PRR5 constituem o ciclo matutino que reprimem de maneira consecutiva o complexo CCA1/LHY do meio dia até o meio da noite, onde TOC1 é expresso. Assim, a repressão em cascata desses genes permite a repressão de CCA1/LHY em um período específico do dia (Figura 1). O Evening Complex, constituído principalmente pelos genes ELF4, ELF3 e LUX formam um complexo que se liga especificamente no promotor do gene PRR9, inativando-o (CHOW et al., 2012; HELFER et al., 2011). Durante a noite, este mesmo complexo atua diretamente na ativação da transcrição

de CCA1 via BOA (BROTHER OF LUX ARRHYTHMO ou NOX), sustentando a manutenção do ciclo de retroalimentação (DAI et al., 2011).

As oscilações diárias de luz e, conseqüentemente, temperatura mudam drasticamente as condições de sobrevivência tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos. Fotorreceptores, como PHYB (PHYTOCHROME), ao captar informações sobre alterações de quantidade e qualidade da luz e temperatura recebida por dia, sofrem mudanças estruturais que culminam em mudanças diretas na regulação dos genes centrais do relógio, sinalizando mudanças transcricionais sistêmicas, o que induz o ajuste sazonal da fisiologia da planta (ERIKSSON; MILLAR, 2003; FOSTER et al., 2007; MILLAR, 2003; YEOM et al., 2014). Isto prova que, apesar de robusta, a cascata de sinalização do relógio circadiano pode ser prontamente alterada, caracterizando uma via essencial na aclimação às mudanças ambientais constantes (ASCHOFF, 1984; KUHLMAN et al., 2017; NONGKYNRIH; SHARMA, 1992).

O florescimento é um exemplo bem conhecido da importância da percepção do comprimento do dia através do relógio, processo intimamente regulado pelos genes centrais e periféricos do relógio. Essa transição do estado vegetativo para o reprodutivo é basicamente orquestrada pelo gene CONSTANS (CO) (SONG et al., 2015). Em dias longos, CO induz a expressão do gene FLOWERING LOCUS (FT) que, por sua vez, regula a expressão de genes indutores de floração como APETALA1 e LEAFY (ABE, 2005; BENLLOCH et al., 2011). Além de mudanças de fotoperíodo, diferentes espectros de irradiância, temperatura e açúcares provenientes da fotossíntese, também podem alterar a expressão de FT, intermediado por receptores de luz, como PHY (ENDO et al., 2013), CRYPTOCHROME (CRY) e a família de

proteínas ZTL/FKF1/LKP2 (KIM et al., 2008; LIU et al., 2013; SHIM et al., 2017) e pelo genes centrais do relógio (Figura 2).

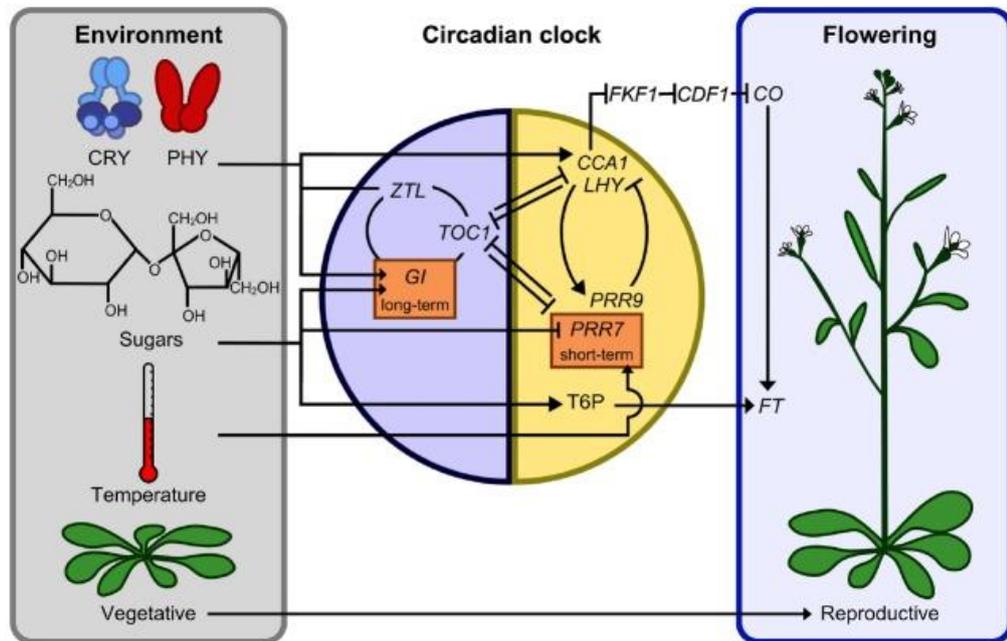


Figura 2. Interação de fatores ambientais e a regulação do florescimento. No quadro à esquerda fotorreceptores, açúcares e temperatura sinalizam mudanças expressão de genes do relógio central (quadro central) que culminam na expressão de florígeno FT. Este induz a mudança do estado vegetativo para o reprodutivo (quadro à esquerda). As abreviações são ZEITLUPE (ZTL), GIGANTEA (GI), FLAVIN BINDING KELCH REPEAT, F BOX 1 (FKF1), CYCLIN DOF FACTOR 1 (CDF1). Adaptado de DODD et al., 2015.

A complexidade dessa via de sinalização foi mais evidenciada quando se descobriu que para cada tecido, uma combinação desses genes está mais expressa, podendo ter funções redundantes e fases de expressão diferente. CCA1, por exemplo, é expresso no começo da manhã no tecido vascular, mas somente depois é expresso no mesófilo para, então ser expresso nas folhas (ENDO, 2016). Esta complexa rede dificulta o estudo mais detalhado do funcionamento do relógio ao nível molecular em organismos multicelulares. Devido a isso, tem-se buscado dentro dos eucariotos fotossintetizantes modelos alternativos que apresentem genomas e transcriptomas mais simples e menos redundantes. É o caso das algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* e *Ostreococcus tauri* que demonstram ritmos circadianos de fotossíntese e

do ciclo de retroalimentação da transcrição e tradução semelhantes às plantas terrestres além de exibirem conservação de sequências nucleotídicas (CORELLOU et al., 2009; DJOUANI-TAHRI et al., 2011, 2010; HEIJDE et al., 2010; MITTAG et al., 2005; MITTAG; WAGNER, 2003; MONNIER et al., 2010; MORANT et al., 2010; PFEUTY et al., 2012; SCHULZE et al., 2010; TROEIN et al., 2011).

Plantas terrestres, junto com as algas verdes (Chlorophyta) e as carófitas (Charophyta) formam o grupo Chloroplastida, importante integrante da linhagem Archaeplastida. Este grupo monofilético inclui também as Rhodophyta (algas vermelhas) e Glaucophyta devido à presença de plasto com dupla membrana plasmática fruto de endossimbiose primária - a partir de uma cianobactéria -, parede celular com celulose, cristas mitocondriais achatadas e síntese de amido (ADL et al., 2005, 2012). A incrível diversidade deste grupo inclui, no mínimo, a origem de 4 eventos independentes de multicelularidade (Rhodophyta, Ulvophyceae, Charophyta e Embryophyta) além da origem de dois eventos de endossimbiose secundária que originaram outros grupos como Alveolata (ciliados, apicomplexa e dinoflagelados), Stramenopiles (diatomáceas e algas pardas), Haptophyta (cocolitoforídeos) e Cryptophyta (KEELING, 2010; NIKLAS, 2014) a partir da endossimbiose de uma alga vermelha, e os grupos Euglenophyta e Chlorarachniophyta a partir da incorporação de uma alga verde. Dessa forma, o grupo Archaeplastida é responsável (diretamente e indiretamente) pela quase totalidade da fotossíntese feita por eucariotos.

O estudo do relógio biológico em diversos organismos do grupo Archaeplastida pode auxiliar na elucidação de mecanismos basais de funcionamento da regulação da expressão gênica da fotossíntese, já que o controle de genes plastidiais pode ser feito por genes nucleares. Um exemplo é o gene SIG5 (SIGMA FACTOR 5) que

desempenha papel fundamental na transcrição do gene *psbD* no cloroplasto de *Arabidopsis* (NAGASHIMA et al., 2004; TSUNOYAMA et al., 2004), além disso, a oscilação circadiana de genes como *psaAB* e *psbA* é profundamente alterada em mutantes *knock-down* do gene *SIG5* (NOORDALLY et al., 2013). Este tipo de regulação já foi descrita também em *Synechococcus elongatus*, uma cianobactéria, e em *Physcomitrella patens*, um musgo (HANAOKA et al., 2012; ICHIKAWA et al., 2008), o que prova a alta conservação deste mecanismo.

Esta conexão da oscilação de nucleares e plastidiais, evidencia que a marcação bioquímica do tempo pode influenciar significativamente a aptidão dos organismos, configurando os genes do relógio como alvos de seleção evolutiva. Ademais, o conhecimento do funcionamento da fisiologia e metabolismo de diversas plantas, algas clorófitas e rodófitas tem se mostrado essencial para o desenvolvimento de linhagens mais produtivas em relação à extração de pigmentos antioxidantes, nutraceuticos em geral e de biocombustíveis (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; BRODIE et al., 2017; FU et al., 2016; JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2011; RAPOSO et al., 2016).

1.2. Relógios biológicos e estresse

Uma característica importante de Archaeplastida é a adaptação ao estresse. Como animais, sabe-se que eucariotos fotossintetizantes crescem mais, acumulam mais energia e se reproduzem com melhor eficiência quando seus relógios internos estão acoplados e sincronizados às oscilações ambientais de seu hábitat (GRUNDY et al., 2015; SEO; MAS, 2015). Qualidade e intensidade de luz e temperatura são os principais fatores que controlam o desenvolvimento de eucariotos fotossintetizantes, e a maioria das vias de sinalização e resposta às mudanças destas condições estão

ligadas ao relógio circadiano, tanto hormonais quando bioquímicas (BHATTACHARYA et al., 2017; KIEŁBOWICZ-MATUK et al., 2014; NITSCHKE et al., 2016).

Em plantas terrestres, os efeitos do estresse no relógio têm sido largamente estudados. Sabe-se, por exemplo, que mudanças no fotoperíodo levam a um aumento significativo nos níveis de ácido jasmônico e transcritos marcadores de estresse, além de diminuição das taxa de fotossíntese e ganho de biomassa (NITSCHKE et al., 2016). Além disso, a quantificação de transcritos em baixas temperaturas revelou um enriquecimento de motivos EE e ABRE (ABA-Responsive Elements), indicando íntima relação do relógio e estresse de temperatura (MIKKELSEN; THOMASHOW, 2009).

De maneira análoga à luz e temperatura, a disponibilidade hídrica também oscila em diversos ambientes, atuando como um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento em diversos organismos. Mais de 130 espécies de algas vermelhas, verdes e plantas são consideradas como organismos pecilohídricos, ou seja, toleram uma ampla faixa de intensidade de desidratação, sobrevivendo mesmo após perder 90% do seu conteúdo relativo de água (ALPERT, 2005a; BOHNERT, 2000). Tolerância vegetativa ao déficit hídrico foi uma das características essenciais para o surgimento das plantas terrestres. Esta característica entretanto foi perdida lentamente ao longo da evolução, assim que maiores taxas de crescimento, complexidade e fixação de carbono foram sendo selecionadas (OLIVER et al., 2000).

Os efeitos da seca afetam intensamente os níveis transcricionais de diversas vias metabólicas em Archaeplastida, como a fotossíntese, enzimas redox, estrutura e composição de membranas, desenvolvimento e ciclo celular. (CELLIER et al., 2000; LEGNAIOLI et al., 2009; MEHTA et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Dentre os

mecanismos mais comuns de tolerância à seca, existem aqueles que agem no reparo dos efeitos da seca, como produção de enzimas que degradam EROs ou reparam membranas, e aqueles que evitam a seca, como acúmulo de água intersticial ou produção de osmólitos que compensam a perda de potencial osmótico (HOEKSTRA et al., 2001b; KRANNER; BIRTIC, 2005). A antecipação da dessecação pode ser um mecanismo essencial para evitar ou diminuir os efeitos da seca (BEWLEY, 1992), já tendo sido registrado em fungos (VITALINI et al., 2007) através de sinalização de MAPK (MAP kinases). Tal mecanismo também pode existir em organismos que estão diariamente expostos à dessecação, como os que habitam a região entre-marés do litoral, como planárias, poliquetos, crustáceos, plantas e macroalgas. (KAISER et al., 2011; MEHTA et al., 2009; TAL et al., 2011; TESSMAR-RAIBLE et al., 2011). A maioria dos estudos já realizados focam em detalhar como organismos respondem ao déficit hídrico, de forma a limitar o dano, entretanto mecanismos mais eficientes são os de prevenção de seca, que podem estar intimamente relacionados ao relógio biológico.

A comparação entre a interação de respostas ao estresse com o relógio biológico em Archaeplastida pode sugerir novos cenários sobre a evolução e funcionamento dos mecanismos de tolerância a condições adversas, além de contribuir de forma consistente sobre os mecanismos de antecipação de estresse através do relógio circadiano.

2. HIPÓTESE

O relógio circadiano em eucariotos fotossintetizantes (Archaeplastida) possui respostas conservadas de adaptação ao estresse

2.1. Objetivos

- 2.1.1. Verificar se a fisiologia de *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) demonstra ritmos circadianos e responde diferencialmente ao estresse hídrico
- 2.1.2. Avaliar se os genes do relógio biológico central modulam o crescimento de *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta) quando submetido a condições indutoras de eflorescências.
- 2.1.3. Medir alterações na oscilação dos genes centrais do relógio circadiano de *Saccharum sp* (Embryophyta) relacionadas com mudanças nos perfis de oscilação dos fatores fisiológicos sob déficit hídrico.

3. REFERENCIAS

- ABE, M. FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. **Science**, v. 309, n. 5737, p. 1052–1056, 2005.
- ADL, S. M. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399–451, 2005.
- ADL, S. M. et al. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429–493, 2012.
- AGRAWAL, A. A. Macroevolution of plant defense strategies. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 2, p. 103–9, 1 fev. 2007.
- AGUILERA, J.; FIGUEROA, F.; NIELL, F. X. Photocontrol of short-term growth in *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta). **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 4, p. 417–424, 26 nov. 1997.
- ALABADÍ, D. et al. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5531, p. 880–3, 3 ago. 2001.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integr. Comp. Biol.**, v. 45, p. 685–695, 2005a.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and comparative biology**, v. 45, n. 5, p. 685–95, 1 nov. 2005b.
- ASCHOFF, J. **Biological Rhythms**. 2. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1984.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. [s.l.] CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
- BELL-PEDERSEN, D. et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nature Reviews: Genetics**, v. 6, n. 7, p. 544–556, 2005.
- BENLLOCH, R. et al. Integrating long-day flowering signals: A LEAFY binding site is essential for proper photoperiodic activation of APETALA1. **Plant Journal**, v. 67, n. 6, p. 1094–1102, 2011.
- BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: Protein Synthesis in Relation to Desiccation and a Potential Role for Protection and Repair Mechanisms. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Eds.). **Water and Life**. 1. ed. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992. p. 141–160.
- BHATTACHARYA, A.; KHANALE, V.; CHAR, B. Plant circadian rhythm in stress signaling. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 147–155, 2017.

- BOHNERT, H. J. What makes desiccation tolerable? **Genome biology**, v. 1, n. 2, p. 4, 2000.
- BRODIE, J. et al. The algal revolution. **Trends in plant science**, v. 22, n. 8, p. 726–738, 2017.
- CARRÉ, I.; KIM, J.-Y. MYB transcription factors in the Arabidopsis circadian clock. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 374, p. 1551–1557, 1 jul. 2002.
- CELLIER, F.; CONÉJÉRO, G.; CASSE, F. Dehydrin transcript fluctuations during a day/night cycle in drought-stressed sunflower. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 343, p. 299–304, fev. 2000.
- CHIARI, Y. et al. Phylogenetic signal in amphibian sensitivity to copper sulfate relative to experimental temperature. **Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America**, v. 25, n. 3, p. 596–602, abr. 2015.
- CHOW, B. Y. et al. ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the Arabidopsis circadian clock. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 2, 2012.
- CORELLOU, F. et al. Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeukaryote *Ostreococcus*. **The Plant cell**, v. 21, n. 11, p. 3436–49, nov. 2009.
- DAI, S. et al. BROTHER OF LUX ARRHYTHMO Is a Component of the Arabidopsis Circadian Clock. **The Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 961–972, 2011.
- DJOUANI-TAHRI, E.-B. et al. A eukaryotic LOV-histidine kinase with circadian clock function in the picoalga *Ostreococcus*. **The Plant journal**, v. 65, n. 4, p. 578–88, fev. 2011.
- DJOUANI-TAHRI, E. B. et al. Insights into the regulation of the core clock component TOC1 in the green picoeukaryote *Ostreococcus*. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 3, p. 332–5, mar. 2010.
- DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5734, p. 630–3, 22 jul. 2005.
- DODD, A. N. et al. Interactions between circadian clocks and photosynthesis for the temporal and spatial coordination of metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.
- DUNLAP, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks. **Cell**, v. 96, p. 271–290, 1999.
- DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. Yes, circadian rhythms actually do affect almost everything. **Cell Research**, v. 26, n. 7, p. 759–760, 31 jul. 2016.
- ENDO, M. et al. PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING accelerates flowering through physical interactions with phytochrome B and CONSTANS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. 18017–18022, 29 out. 2013.

ENDO, M. **Tissue-specific circadian clocks in plants** *Current Opinion in Plant Biology*, 2016.

ERIKSSON, M. E.; MILLAR, A. J. The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. *Plant physiology*, v. 132, n. 2, p. 732–8, jun. 2003.

ESCASSI, L. et al. Potassium drives daily reversible thallus enlargement in the marine red alga *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta). *Planta*, v. 214, n. 5, p. 759–66, mar. 2002.

FARRÉ, E. M.; LIU, T. The PRR family of transcriptional regulators reflects the complexity and evolution of plant circadian clocks. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 16, n. 5, p. 621–629, out. 2013.

FOSTER, R. G.; HANKINS, M. W.; PEIRSON, S. N. Light, Photoreceptors, and Circadian Clocks. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 362p. 3–28.

FU, W. et al. Algal Cell Factories: Approaches, Applications, and Potentials. *Marine drugs*, v. 14, n. 12, 13 dez. 2016.

FUJIWARA, S. et al. Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in Arabidopsis. *The Plant cell*, v. 20, n. 11, p. 2960–71, nov. 2008.

GARDNER, M. J. et al. How plants tell the time. *The Biochemical journal*, v. 397, n. 1, p. 15–24, 1 jul. 2006.

GENDRON, J. M. et al. Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 8, p. 3167–72, 21 fev. 2012.

GOLDEN, S. S.; STRAYER, C. Time for plants. Progress in plant chronobiology. *Plant physiology*, v. 125, n. 1, p. 98–101, jan. 2001.

GREEN, R. M.; TOBIN, E. M. The role of CCA1 and LHY in the plant circadian clock. *Developmental cell*, v. 2, n. 5, p. 516–8, maio 2002.

GRUNDY, J.; STOKER, C.; CARRÉ, I. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 27 ago. 2015.

GUENTHER, R. J.; MARTONE, P. T. Physiological performance of intertidal coralline algae during a simulated tidal cycle. *Journal of Phycology*, v. 50, n. 2, p. 310–321, 12 abr. 2014.

HANAOKA, M. et al. RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 31, p. 26321–26327, 2012.

HANSON, K. L.; HRVOJ-MIHIC, B.; SEMENDEFERI, K. A Dual Comparative Approach: Integrating Lines of Evidence from Human Evolutionary Neuroanatomy and

Neurodevelopmental Disorders. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 84, n. 2, p. 135–155, 2014.

HARDIN, P. E.; HALL, J. C.; ROSBASH, M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. **Nature**, v. 343, n. 6258, p. 536–540, 1990.

HARMER, S. L. The Circadian System in Higher Plants. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 357–377, 28 abr. 2009.

HEIJDE, M. et al. Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 10, p. 1614–26, out. 2010.

HELPER, A. et al. LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the Arabidopsis core clock. **Current Biology**, v. 21, n. 2, p. 126–133, 2011.

HEMMES, H. et al. Circadian Clock Regulates Dynamic Chromatin Modifications Associated with Arabidopsis CCA1/LHY and TOC1 Transcriptional Rhythms. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 12, p. 2016–2029, dez. 2012.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, p. 431–438, 2001a.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001b.

ICHIKAWA, K. et al. The plastid sigma factor SIG5 is involved in the diurnal regulation of the chloroplast gene psbD in the moss *Physcomitrella patens*. **FEBS Letters**, v. 582, n. 3, p. 405–409, 2008.

INMAN-BAMBER, N. G. Automatic plant extension measurement in sugarcane in relation to temperature and soil moisture. **Field Crops Research**, v. 42, n. 2–3, p. 135–142, 1 ago. 1995.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. Seaweed as a Source of Novel Nutraceuticals. In: **Advances in food and nutrition research**. [s.l: s.n.]. v. 64p. 325–337.

KAISER, T. S.; NEUMANN, D.; HECKEL, D. G. Timing the tides: genetic control of diurnal and lunar emergence times is correlated in the marine midge *Clunio marinus*. **BMC genetics**, v. 12, p. 49, jan. 2011.

KEELING, P. J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1541, p. 729–48, 12 mar. 2010.

KEHOE, D. M. et al. Two 10-bp regions are critical for phytochrome regulation of a *Lemna gibba* Lhcb gene promoter. **The Plant cell**, v. 6, n. 8, p. 1123–34, ago. 1994.

- KENIGSBUCH, D.; TOBIN, E. M. A region of the Arabidopsis Lhcb1*3 promoter that binds to CA-1 activity is essential for high expression and phytochrome regulation. **Plant physiology**, v. 108, n. 3, p. 1023–7, jul. 1995.
- KIEŁBOWICZ-MATUK, A.; REY, P.; RORAT, T. Interplay between circadian rhythm, time of the day and osmotic stress constraints in the regulation of the expression of a Solanum Double B-box gene. **Annals of botany**, v. 113, n. 5, p. 831–42, abr. 2014.
- KIM, S. Y.; YU, X.; MICHAELS, S. D. Regulation of CONSTANS and FLOWERING LOCUS T expression in response to changing light quality. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 269–79, set. 2008.
- KRANNER, I.; BIRTIC, S. **A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance.** Integrative and Comparative Biology. **Anais...**2005
- KRAUSE, S. et al. Weak phylogenetic signal in physiological traits of methane-oxidizing bacteria. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, n. 6, p. 1240–1247, jun. 2014.
- KUHLMAN, S. J.; CRAIG, L. M.; DUFFY, J. F. Introduction to Chronobiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2017.
- LAI, A. G. et al. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 17129–17134, 16 out. 2012.
- LAMBERT, S.; BOUGET, F.-Y. **2007-2016 Time series analysis of phytoplankton community in the bay of Banyuls (SOLA).** [s.l.] Université Pierre et Marie Curie, 2017.
- LEGNAIOLI, T.; CUEVAS, J.; MAS, P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. **The EMBO journal**, v. 28, n. 23, p. 3745–57, 2 dez. 2009.
- LI, S. The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. **Plant signaling & behavior**, v. 10, n. 7, p. e1044192, 2015.
- LIU, H. et al. Arabidopsis CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17582–7, 22 out. 2013.
- LU, S. X. et al. CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL Function Synergistically in the Circadian Clock of Arabidopsis. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 150, n. 2, p. 834–843, 2009.
- LÜNING, K. Light as an environmental signal. In: **Seaweeds: Their environment, biogeography and ecophysiology.** [s.l.: s.n.]. p. 411.
- LÜNING, K. Circadian growth rhythm in juvenile sporophytes of Laminariales (Phaeophyta). **Journal of Phycology**, v. 30, n. 2, p. 193–199, abr. 1994.

LÜNING, K. Circadian growth in *Porphyra umbilicalis* (Rhodophyta): spectral sensitivity of the circadian system. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 1, p. 52–58, 6 fev. 2001.

LÜNING, K.; TITLYANOV, E.; TITLYANOVA, T. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. III. The red alga *Porphyra umbilicalis*. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 2, p. 167–173, 3 maio 1997.

MAKAROV, V. N.; SCHOSCHINA, E. V.; LÜNING, K. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. I. Juvenile sporophytes of Laminariales (Phaeophyta). **European Journal of Phycology**, v. 30, n. 4, p. 261–266, 17 nov. 1995.

MEHTA, P. A. et al. A diurnally regulated dehydrin from *Avicennia marina* that shows nucleocytoplasmic localization and is phosphorylated by Casein kinase II in vitro. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 47, n. 8, p. 701–9, ago. 2009.

MIKKELSEN, M. D.; THOMASHOW, M. F. A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 60, n. 2, p. 328–339, out. 2009.

MILLAR, A. J. et al. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5201, p. 1161–3, 24 mar. 1995.

MILLAR, A. J. A suite of photoreceptors entrains the plant circadian clock. **J Biol Rhythms**, v. 18, n. 3, p. 217–226, 2003.

MITTAG, M.; KIAULEHN, S.; JOHNSON, C. H. The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? **Plant physiology**, v. 137, n. 2, p. 399–409, fev. 2005.

MITTAG, M.; WAGNER, V. The circadian clock of the unicellular eukaryotic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biological chemistry**, v. 384, n. 5, p. 689–95, maio 2003.

MIZOGUCHI, T. et al. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. **Developmental Cell**, v. 2, n. 5, p. 629–641, 2002.

MONNIER, A. et al. Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles. **BMC genomics**, v. 11, p. 192, jan. 2010.

MORANT, P.-E. et al. A robust two-gene oscillator at the core of *Ostreococcus tauri* circadian clock. **Chaos (Woodbury, N.Y.)**, v. 20, n. 4, p. 045108, dez. 2010.

MOULAGER, M. et al. Light-dependent regulation of cell division in *Ostreococcus*: evidence for a major transcriptional input. **Plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 1360–9, jul. 2007.

NAGASHIMA, A. et al. The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the psbD Blue Light-Responsive Promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*.

Plant and Cell Physiology, v. 45, n. 4, p. 357–368, 2004.

NAGEL, D. H. et al. Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 34, p. E4802–E4810, 2015.

NESPOLO, R. F. et al. Aerobic power and flight capacity in birds: a phylogenetic test of the heart-size hypothesis. **The Journal of experimental biology**, 17 nov. 2017.

NIKLAS, K. J. The evolutionary-developmental origins of multicellularity. **American journal of botany**, v. 101, n. 1, p. 6–25, jan. 2014.

NITSCHKE, S. et al. Circadian Stress Regimes Affect the Circadian Clock and Cause Jasmonic Acid-Dependent Cell Death in Cytokinin-Deficient Arabidopsis Plants. **The Plant Cell**, p. tpc.00016.2016, 2016.

NOBLE, D. Physiology is rocking the foundations of evolutionary biology. **Experimental Physiology**, v. 98, n. 8, p. 1235–1243, 2013.

NONGKYNRIH, P.; SHARMA, V. K. Biological clocks: mechanisms and developments. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 13, n. 3–4, p. 201–17, 15 maio 1992.

NOORDALLY, Z. B. et al. Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6125, p. 1316–9, 15 mar. 2013.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 85–100, 2000.

PFEUTY, B. et al. Circadian clocks in changing weather and seasons: Lessons from the picoalga *Ostreococcus tauri*. **BioEssays**, v. 34, n. 9, p. 781–90, set. 2012.

PITTENDRIGH, C. S.; TAKAMURA, T. Temperature dependence and evolutionary adjustment of critical night length in insect photoperiodism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 20, p. 7169–73, out. 1987.

PROCTOR, M. C. F.; TUBA, Z. **Poikilohydry and homoihydry: Antithesis or spectrum of possibilities?** **New Phytologist**, 2002.

PRUNEDA-PAZ, J. L. et al. A Functional Genomics Approach Reveals CHE as a Component of the Arabidopsis Circadian Clock. **Science**, v. 323, n. 5920, p. 1481–1485, 2009.

RAPOSO, M. DE J.; MORAIS, A.; MORAIS, R. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 27, 28 jan. 2016.

RYMEN, B. et al. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through

transcriptional changes of cell cycle genes. **Plant physiology**, v. 143, n. 3, p. 1429–38, mar. 2007.

SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D.; JAHNKE, L. S. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützing (Rhodophyta, Bangiales). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 361, n. 2, p. 83–91, jul. 2008.

SANCHEZ, S. E.; KAY, S. A. The plant circadian clock: From a simple timekeeper to a complex developmental manager. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 12, 2016.

SAWICKI, M. et al. Cold-night responses in grapevine inflorescences. **Plant Science**, v. 239, p. 115–127, out. 2015.

SCHUBERT, H. et al. Circadian rhythm of photosynthesis in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): independence of the cell cycle and possible photosynthetic clock targets. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 4, p. 423–430, nov. 2004.

SCHULZE, T. et al. How the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* keeps time. **Protoplasma**, v. 244, n. 1–4, p. 3–14, ago. 2010.

SEO, P. J.; MAS, P. **STRESSing the role of the plant circadian clock** **Trends in Plant Science**, 2015.

SHAFER, D. J.; SHERMAN, T. D.; WYLLIE-ECHEVERRIA, S. Do desiccation tolerances control the vertical distribution of intertidal seagrasses? **Aquatic Botany**, v. 87, p. 161–166, 2007.

SHIM, J. S.; KUBOTA, A.; IMAIZUMI, T. Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 5–15, jan. 2017.

SONG, Y. H. et al. Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 441–464, 29 abr. 2015.

SULLIVAN, S. et al. Functional characterization of *Ostreococcus tauri* phototropin. **New Phytologist**, v. 209, n. 2, p. 612–623, jan. 2016.

TAL, O. et al. Melatonin as an antioxidant and its semi-lunar rhythm in green macroalga *Ulva* sp. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 6, p. 1903–10, mar. 2011.

TESSMAR-RAIBLE, K.; RAIBLE, F.; ARBOLEDA, E. Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 33, n. 3, p. 165–72, mar. 2011.

TITLYANOV, E. A.; TITLYANOVA, T. V.; LÜNING, K. Diurnal and circadian periodicity of

mitosis and growth in marine macroalgae. II. The green alga *Ulva pseudocurvata*. **European Journal of Phycology**, v. 31, n. 2, p. 181–188, 18 maio 1996.

TOMANEK, L.; HELMUTH, B. Physiological ecology of rocky intertidal organisms: a synergy of concepts. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 4, p. 771–5, 2002.

TROEIN, C. et al. Multiple light inputs to a simple clock circuit allow complex biological rhythms. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 66, n. 2, p. 375–85, abr. 2011.

TSUNOYAMA, Y. et al. Blue light-induced transcription of plastid-encoded psbD gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3304–3309, 2004.

VITALINI, M. W. et al. Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 46, p. 18223–8, 13 nov. 2007.

WANG, Z. Y. et al. A Myb-Related Transcription Factor Is Involved in the Phytochrome Regulation of an Arabidopsis Lhcb Gene. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 9, n. 4, p. 491–507, 1 abr. 1997.

WOELFLE, M. A. et al. The Adaptive Value of Circadian Clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. **Current Biology**, v. 14, n. 16, p. 1481–1486, 24 ago. 2004.

YEOM, M. et al. **How do phytochromes transmit the light quality information to the circadian clock in arabidopsis?** **Molecular Plant**, 2014.

YOUNG, M. W.; KAY, S. A. Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 9, p. 702–715, 2001.

ZHANG, X. et al. De novo sequencing and analysis of the *Ulva linza* transcriptome to discover putative mechanisms associated with its successful colonization of coastal ecosystems. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 565, jan. 2012.

**4. CAPÍTULO 1 – Relógio biológico e tolerância ao déficit hídrico
em *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta, Florideophyceae)**

5. INTRODUÇÃO

Gracilaria tenuistipitata (Rhodophyta, Florideophyceae) é uma macroalga vermelha que ocorre no sudeste asiático comumente fixa em pedras em poças nas regiões entre-marés e infra-maré (BARUFI, 2010; WANG, 2014). É considerada uma espécie altamente tolerante às condições adversas, já que sobrevive sob grande espectro de salinidade, temperatura, pH, concentração de nutrientes e metais (HAGLUND, 1992; TONON, 2009; WANG et al., 2014). Devido à esta ampla tolerância e também à presença de ágar, é considerada como uma espécie alvo para a indústria extrativista. Além disso, demonstra interesse ambiental por sua tendência de formação de blooms, ou eflorações, causando prejuízos em áreas de pesca, aquicultura e turismo (ARMISEN, 1995; MCLACHLAN, 1986; WANG et al., 2014).

Nos ambientes de mesolitoral ocupados por *G. tenuistipitata*, a desidratação é uma condição cíclica que seleciona espécies tolerantes à dessecação a fim de evitar o dano crescente a cada ciclo de maré. Assim, não é uma surpresa que algas de mesolitoral tenham um grande arsenal fisiológico e bioquímico de mecanismos que evitem ou diminuam os danos por perda de água, por exemplo intensa atividade de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e tioredoxina, além da rápida recuperação de fotossistemas danificados (ABE, 2001; COLLÉN, 1999; CRUZ DE CARVALHO, 2008; GUENTHER, 2014; HAMMAD, 2014; JI, 2002; KUMAR, 2011a; LIU, 2014; NOCTOR, 2014; SHAFER, 2007; TOMANEK, 2002). Entretanto, pouco se sabe das respostas à desidratação à nível transcricional neste grupo. Alguns transcriptomas de algas vermelhas foram feitos para verificar respostas à outros estresses (CHOI, 2012; COLLÉN,

2006a, 2006b; IM, 2014; KOWALCZYK, 2014; TEO, 2009; XIE, 2013; ZHOU, 2013), mas pouca atenção tem sido dada ao estresse por dessecação.

O método mais comum para avaliar pontualmente níveis de expressão é a RT-qPCR (reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction). Entretanto, esse método permanece pouco reprodutível em algas agarófitas devido à baixa qualidade e rendimento de RNA obtido. Há, ainda, uma importante ausência de métodos amplamente padronizados, desde a extração de RNA à síntese de cDNA e normalização de primers. A padronização da extração de RNA permanece o ponto chave, já que a maioria dos métodos recomendam iniciar a extração a partir de grande quantidade de biomassa algal (FALCÃO, 2008; MACKAY, 1991; WU, 2012), devido ao fato de que em média apenas 1% da massa fresca das algas vermelhas contém células com material genético, que além disso, frequentemente pode co-precipitar com contaminantes, por exemplo agarpectina. Diversos métodos envolvendo a extração de RNA de macroalgas já foram publicados (COLLÉN, 2011; FALCÃO et al., 2008; GRECO, 2014; KOWALCZYK et al., 2014; MA, 2011). Isso se deve ao fato de ser muito difícil obter RNAs íntegros e puros devido à presença de polissacarídeos complexos e sulfatados, além de compostos polifenólicos que co-precipitam com o RNA e podem inibir reações down-stream à extração de RNA e/ou gerar uma subestimação da qualidade e quantidade do RNA.

A seleção de genes de referência estáveis e validação de primers também são procedimentos de extrema importância para essa técnica (DING, 2014; KOWALCZYK et al., 2014; KOZERA, 2013; LE BAIL, 2008). O desenho de primers de alta eficiência está diretamente relacionado com a disponibilidade das sequências gênicas alvo. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias que busquem estes genes por similaridade de

sequência pode facilitar este tipo de análise. Cerca de 25 transcriptomas de rodófitas estão disponíveis, principalmente do gênero *Gracilaria*, em que foram analisados transcritos diferencialmente expressos devido a exposição a metais, derivados de petróleo, sob estresse salino e luminoso. Dentro desses transcritos, várias sequências candidatas aos genes do relógio biológico puderam ser identificados, entretanto com baixos índices de similaridade com os de plantas (COLLÉN, 2013).

O crescimento de *Gracilaria* é medido por pesagem da biomassa fresca, refletindo de forma realista e reprodutível a aclimação à diferentes tipos de tratamentos (BARUFI et al., 2010; FERREIRA, 2006; HAGLUND et al., 1992; MENDES, 2012, 2013, 2014; TERADA, 2013; URSI, 2008; XIA, 2004; YU, 2013). A taxa de crescimento em macroalgas, assim como em plantas (APELT, 2017), oscila ao longo do dia e é um parâmetro robusto para se medir ritmos e influência de diferentes fatores abióticos na fisiologia e aclimação de macroalgas (GRANBOM, 2007; LÜNING, 1992, 1994, 1997, 2001; MAKAROV, 1995; OOHUSA, 1980; TITLYANOV, 1996). Entretanto, sua medição repetitiva é praticamente inviável e não mostra mudanças mensuráveis ao longo do dia. Para tanto foi desenvolvido um método semi-automático de medição do crescimento de algas por processamento de imagens (LÜNING, 1992), que se mostrou muito sensível para algas foliáceas, mas não foi testado em algas cilíndricas, como as do gênero *Gracilaria*.

6. HIPÓTESE

Gracilaria tenuistipitata possui ritmos circadianos e apresenta tolerância ao estresse hídrico

6.1. Objetivos

- 6.1.1. Testar como a taxa de crescimento e fotossíntese de *G.tenuistipitata* oscilam em condições circadianas
- 6.1.2. Avaliar a tolerância de *G.tenuistipitata* ao déficit hídrico
- 6.1.3. Testar como genes de resposta à dessecação são expressos em *G.tenuistipitata*

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Cultivo de *Gracilaria tenuistipitata*

Gametófitos femininos de *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia foram obtidos no laboratório de algas marinhas (LAM-USP) sob supervisão das professoras Mariana Cabral de Oliveira e Estela Maria Plastino do departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP. Estas algas são provenientes da província de Hainan – China, da cidade de Haikou e estão em cultivo unialgal, porém não axênico, há 27 anos (BARUFI et al., 2010) no banco de germoplasma “Edison José de Paula” (COSTA, 2012).

Talos dos cultivos-mãe foram mantidos em água do mar natural coletada em São Sebastião – SP. A esterilização foi feita por filtração em 11 μm e 0,45 μm e aquecida a 90°C por 1hr. Este meio foi enriquecido com a solução von-Stosch 50% (YOKOYA, 1996), rica em nitrato, potássio, fosfato, minerais e vitaminas. Para os experimentos, ápices de 2 cm sem ramificações cultivados tanto em placas de Petri de 90mm com 30 ml de ASW quanto em Erlenmeyers de 100, 300 ou 500 ml, sempre com cerca de 75% da capacidade total e com no máximo 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de biomassa. Cultivos em frascos foram em agitação horizontal (1000 RPM), a 25°C e regime diurno 12:12 sob 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiância (medido com um LI-COR LI-1400 quantum sensor esférico subaquático) emitida por lâmpadas fluorescentes tubulares de 40W e de LED branca.

7.2. Taxa de crescimento e dessecação

O experimento de dessecação foi feito com 40 talos (2 cm; 50 mg) secos cuidadosamente em lenços de papel e colocados dentro de placas de Petri abertas durante uma faixa crescente de tempo à atmosfera de câmaras de cultivo com umidade controlada a 60%. O grau de dessecação foi mensurado a partir da pesagem da biomassa fresca em balança analítica antes e imediatamente após a dessecação. Após a reidratação, os talos foram retornados ao cultivo para cálculo do índice de despigmentação (ID) e da taxa de crescimento relativo diário (TCRD), para avaliação inicial dos efeitos do estresse e quantificação da tolerância. A TCRD foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$TCRD = [\ln(P_f) - \ln(P_i)] \cdot t^{-1},$$

onde P_f é o peso final, P_i é o peso inicial e t é o número de dias. A TRCD foi definida como $TCRD \times 100$ (KAIN, 1987).

A taxa de desidratação foi calculada a partir da fórmula:

$$TD = 100 \cdot (P_i - P_f) / (P_i - 5.5),$$

onde P_i é o peso inicial; P_f é o peso final e 5,5 é o peso médio da massa desidratada (em mg), de 3 amostras de ápices de 50 mg, em liofilizador (-40°C; 0,1 mBar) durante 24hrs. Esta fórmula permitiu o cálculo da tolerância máxima de desidratação (TD_{max}) para posteriormente realizar a reidratação dos ápices e a medida de sua TCRD após 3 dias e os efeitos agudos do estresse hídrico após 1, 2 e 4hr. O ID foi calculado a partir da porcentagem ($cm \cdot cm^{-1}$) dos talos que estavam pálidos. Após a exposição a uma TD não letal os talos foram coletados em tubos de 2 ml de fundo em "U" com 2 esferas de metal de

5 mm, congelados em nitrogênio líquido e pulverizados em um moinho (Retsch) por 1 min a 60hz. Três réplicas biológicas foram feitas para cada amostra.

7.3. Delayed fluorescence

Utilizamos a técnica de Delayed fluorescence (GOULD, 2009) para analisar ritmos circadianos da fotossíntese. Esta técnica consiste na medição da emissão de fótons das clorofilas a do fotossistema II após a recombinação de cargas entre a plastoquinona Q_A e o centro de reação P680 assim que a iluminação constante é encerrada. Foi reproduzida em câmara escura (Dark Box DB-2 – Photek Limited – UK) utilizando uma câmera de quantificação de fótons (HRPCS4 Camera – Photek Limited - UK) automática que multiplica e integra os sinais da fluorescência da clorofila por 60 segundos. A mesma configuração de ápices da seção 6.2 foi utilizada neste procedimento. Os períodos e fases dos ritmos foram estimados com o programa BRASS (Biological Rhythms Analysis Software System) baseado em testes FFT-NLLS (Fast Fourier Transformants – Non Linear least Squares).

7.4. Crescimento de *Gracilaria tenuistipitata* por imageamento

Imagens de *G. tenuistipitata* foram obtidas com uma câmera GoPro Hero3+ adaptada com o acessório jaws e uma lente macro (PolarPro) a um suporte universal. Para evitar que os talos se movessem durante o experimento, uma gota de 30 μ l de gel de agarose (1%) líquida foi colocada na posição desejada na placa de Petri e, após incubação por 10s para solidificar e resfriar o gel, o talo era adicionado. Uma base de acrílico transparente (300x300x2 mm), com uma folha A4 como difusor, foi usada para apoiar a placa de Petri sobre uma fonte de luz LED 5W 3500K. Para o experimento circadiano, a câmera foi programada para realizar timelapses com intervalo de 60s durante 3 dias. Os programas ImageJ (SCHNEIDER, 2012), CellProfiler (CARPENTER, 2006) foram usados para o processamento em lote (batch processing) das imagens e cálculo de comprimento linear do

eixo central e área total dos talos. A mesma configuração foi usada para validar o imageamento por ganho de massa por correlação linear e também para experimentos de dessecação.

7.5. Extração do RNA e síntese de cDNA

A maioria dos métodos já descritos são demorados e não garantem uma boa extração a partir de pouca massa o que é imprescindível para um experimento circadiano. Testamos os seguintes métodos: TRIzol Plus RNA Purification System (Thermo Fisher), PureLink Plant RNA Reagent (Thermo Fisher), RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) e o método Tris-Sarkosyl-saline (TSS) (GRECO et al., 2014). Adaptações foram feitas para aumentar a eficiência da extração, medida pela quantidade de RNA extraído por massa fresca ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) e uma redução no tempo total do procedimento.

Após obter concentração suficiente de RNA puro, tratou-se com DNase I da empresa New Engle Biolabs para degradar o DNA co-precipitado remanescente, para evitar falsos positivos. Após isso, limpou-se o RNA com colunas de sílica (Qiagen) para retirar nucleotídeos e proteínas remanescentes do tratamento com DNase. A quantidade e qualidade amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% não desnaturante por 30 min a 100V e também em nanofotômetro onde se mediu as razões de absorbância A_{260}/A_{280} ($<1,8$) para contaminação por proteínas e A_{260}/A_{230} ($<1,8$) para contaminação por compostos fenólicos ou carboidratos complexos.

A reação de RT-PCR para obtenção de cDNA foi feita a partir de 1,2 μg de RNA pelo protocolo SuperScript® III First-Strand Synthesis supermix – Invitrogen com primers OligoDT e hexameros. Para qPCR utilizou-se o kit Fast SYBR® green master mix em 12 μl com 200 mM de concentração final de primers. O protocolo padrão de temperaturas do termociclador StepOne (ThermoFisher) foi usado. Como controles negativos preparou-se a reação de RT-

qPCR com RNA não convertido a cDNA (RT⁻) e a solução de de RT-qPCR com primers e água, em vez de cDNA. Fez-se também curvas de diluição (fator de 1:5) a partir de 60 ng·µl⁻¹ de cDNA.

7.6. Desenho dos primers

Foram feitos primers 12 genes, sendo nove para a avaliação de estabilidade de expressão para serem usados como referencias endógenas no método $\Delta\Delta C_t$ e três para avaliação dos efeitos de dessecação (Tabela A.1). Todos os genes foram escolhidos com base em estudos similares em outras algas vermelhas, inclusive os 3 genes de resposta à desidratação (DING et al., 2014; KONG, 2014; KOWALCZYK et al., 2014; TEO, 2007; WU et al., 2012). Etiquetas de sequências expressas (Expressed sequence tags – ESTs) foram obtidas do banco de dados de ESTs de *G. tenuistipitata* (COLLÉN et al., 2011) através da busca dos números de identificação (Tabela A.1). Os softwares PRIMER3 (UNTERGASSER, 2012) e Primer Express (ThermoFisher) foram usados para o desenho dos primers a partir dos seguintes parâmetros: 20 pb de comprimento, 50 pb de tamanho de amplicon, 50% de conteúdo GC e 80 °C de temperatura de melting. A especificidade e eficiência da amplificação foram confirmadas através de curvas de melting após cada qPCR e pelas curvas de diluição, respectivamente. O software geNorm (VANDESOMPELE, 2002) foi usado para calcular a combinação mais estável dos genes de referência.

Tabela A1. Sequencias dos primers de *Gracilaria tenuistipitata* utilizados neste estudo. Marcados com ^a estão oligonucleotídeos desenhados previamente por TONON, 2009.

Gene	Descrição	Número de Acesso GenBank	Sequencias iniciadoras
ACT1	Actin 1 ^a	HS978126.1	5' – AAGATGAGTACGTTGGTGACGC – 3' 5' –ATCTTTTCCATATCGTCCCAGTT – 3'
ATP5B	ATP synthase subunit b	HS978464.1	5' – AACCTCTGAAGCGTCAAG – 3' 5' – AGTCGTAGTGGTCACCTTGA – 3'
EEF2	Translation elongation factor eEF2	HS978262.1	5' – GAGTTGCACCTGGAGATCTG – 3' 5' – CACGAATTTCTGCACCGTTC – 3'
G6PD	Glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase	HS980152.1	5' – CGGGGAGCTGAATTGTCTTT – 3' 5' – TAGTTGCGAATGTCTCTGGC – 3'
GLB	b -galactosidase	HS979271.1	5' – CACCAAATACGGAGACAGGG – 3' 5' – CGTGAACCATGTGATCAGA – 3'
GTF2B	Transcription initiation factor IIB ^a	HS981517.1	5' – GTGGTGCCTGATGACTTTGA – 3' 5' –TCACGTTTCTCCAGCACATT – 3'
NIA2	Nitrate reductase	HS980550.1	5' - CACCATTGACAATTTTCGTGTTTC - 3' 5' - GGCACGGCATCGAAGCT- 3'
OEE1	Plastid oxygen-evolving enhancer 1 ^a	HS978096.1	5' – CGTGCCTCGTTGGCTGATTC – 3' 5' – GAGCAGTAGCGGCGAGTAGG – 3'
RPL17	60S ribosomal protein L17	HS977908.1	5' – CATGCAGGTGAACAAGGCTA – 3' 5' – GACACGGCTGACTCATGAAT – 3'
RPL51	60S ribosomal L51	HS981775.1	5' –AGGGAAAAGAGACGTCAGGA – 3' 5' – ACCAACCAGTTACTCCGTA – 3'
TRX	Thioredoxin	HS978023.1	5' – GCTCGTTGCCGTGATGTTCC – 3' 5' – AGTGGCTTGTTCCGAGGTTTCAG – 3'
TUB	b-tubulin	HS979294.1	5' – GAAGGTGCAGAGCTCATTGA – 3' 5' – ACAAGCCTCGGTTTCATTGT – 3'

7.7. Análise estatística

As análises de variância e comparações par-a-par dos testes foram feitas por testes de Tukey-HSD (Honest significant difference). Para a validação da técnica de

imageamento, fez-se uma correlação linear entre os valores de peso e das medidas de comprimento e área.

8. RESULTADOS

8.1. Ritmos em *Gracilaria tenuistipitata*

8.1.1. Delayed Fluorescence

Foi possível estabelecer a técnica de *Delayed Fluorescence* e se conseguiu verificar oscilação circadiana robusta da fluorescência da clorofila de *G. tenuistipitata* ao longo de 120 horas (Figura 1.1). Observamos que em todos experimentos exibiram um período próximo a 25 horas.

Houve um período de aclimação às condições de luz constante correspondente às primeiras 24hrs em todos os experimentos, onde há oscilação arritmica da fluorescência. A densidade de biomassa maior que $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ causou um decaimento da fluorescência relativo à deficiência nutricional (Figura 1.1B).

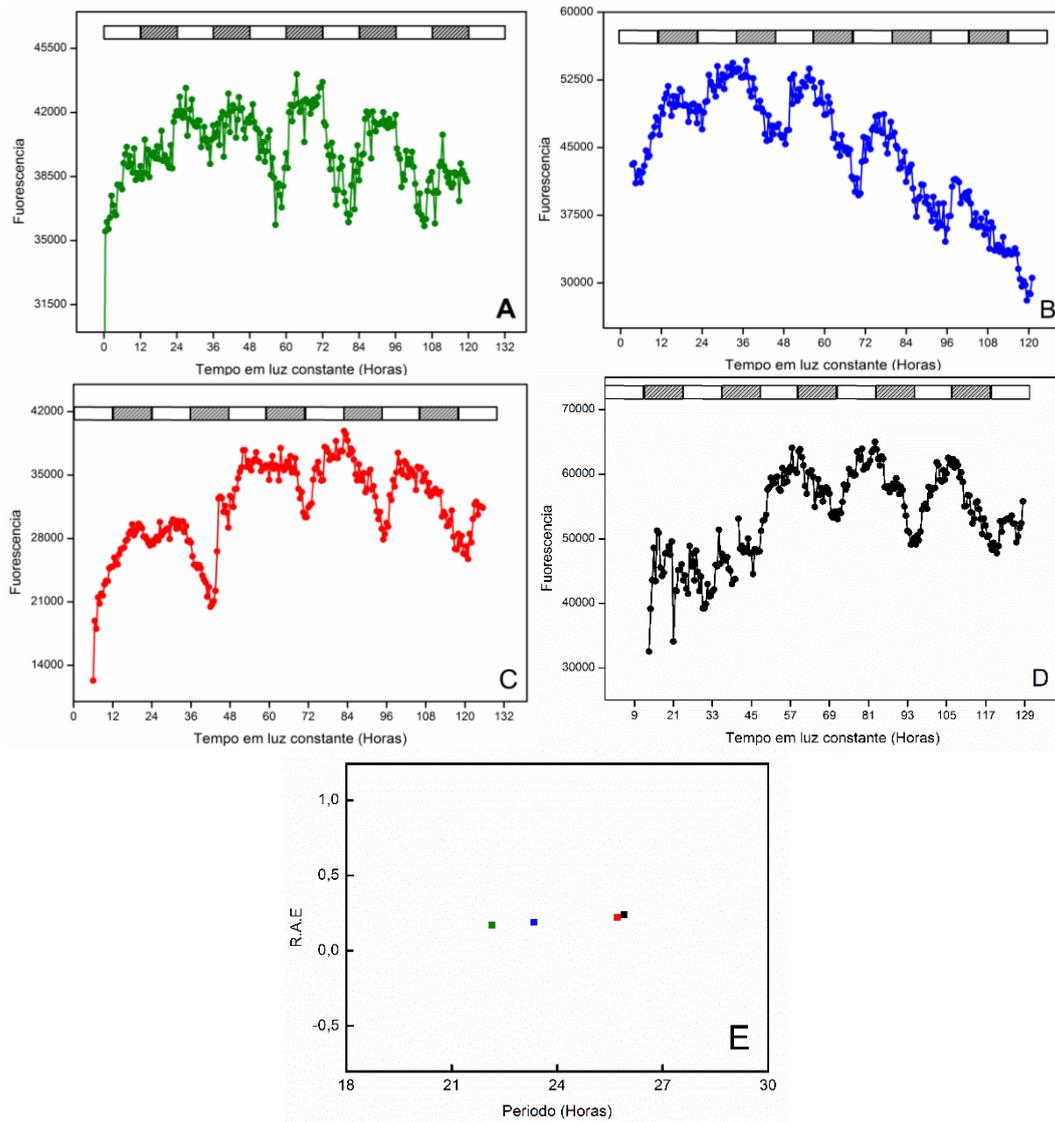


Figura 1.1. A-D) Réplicas de medições de Delayed Fluorescence em *G. tenuistipitata*. **E)** estimação do período de cada grupo de ápices plotados contra seus respectivos RAE (Relative Amplitude Error).

8.1.2. Crescimento de área por imageamento

Estabeleceu-se a medida de crescimento em área e comprimento de forma semiautomática, através do timelapse de fotos obtidas ao longo de 3 dias, constantemente.

Para validar a metodologia, correlacionou-se o ganho de biomassa por ganho de área (cm^2) e comprimento (cm), obtendo-se correlação significativa (R^2 de 0,96 e 0,98, respectivamente). Após normalização de pixels por centímetros, verificou-se que houve crescimento de $0,2 \text{ cm}^2 \cdot \text{d}^{-1}$ e $4 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ relativos à $4,2 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ($24,6 \% \cdot \text{d}^{-1}$) (Figura 1.2C).

Os ápices cresceram 12% ($38 \text{ pixels} \cdot \text{h}^{-1}$; Figura 1.3A) e após isso chegaram à fase estacionária. Foi possível obter um padrão de crescimento ultradiano, com período de 6 horas (Figura 1.3B). Percebeu-se também a contração dos talos, quando valores negativos são demonstrados no eixo x.

Avaliou-se também, a cinética de desidratação dos talos da alga por imageamento (Figura 1.4C). Percebe-se que em cerca de 1h 40min a dessecação atinge 40% e em 3,5 h atinge 100%.

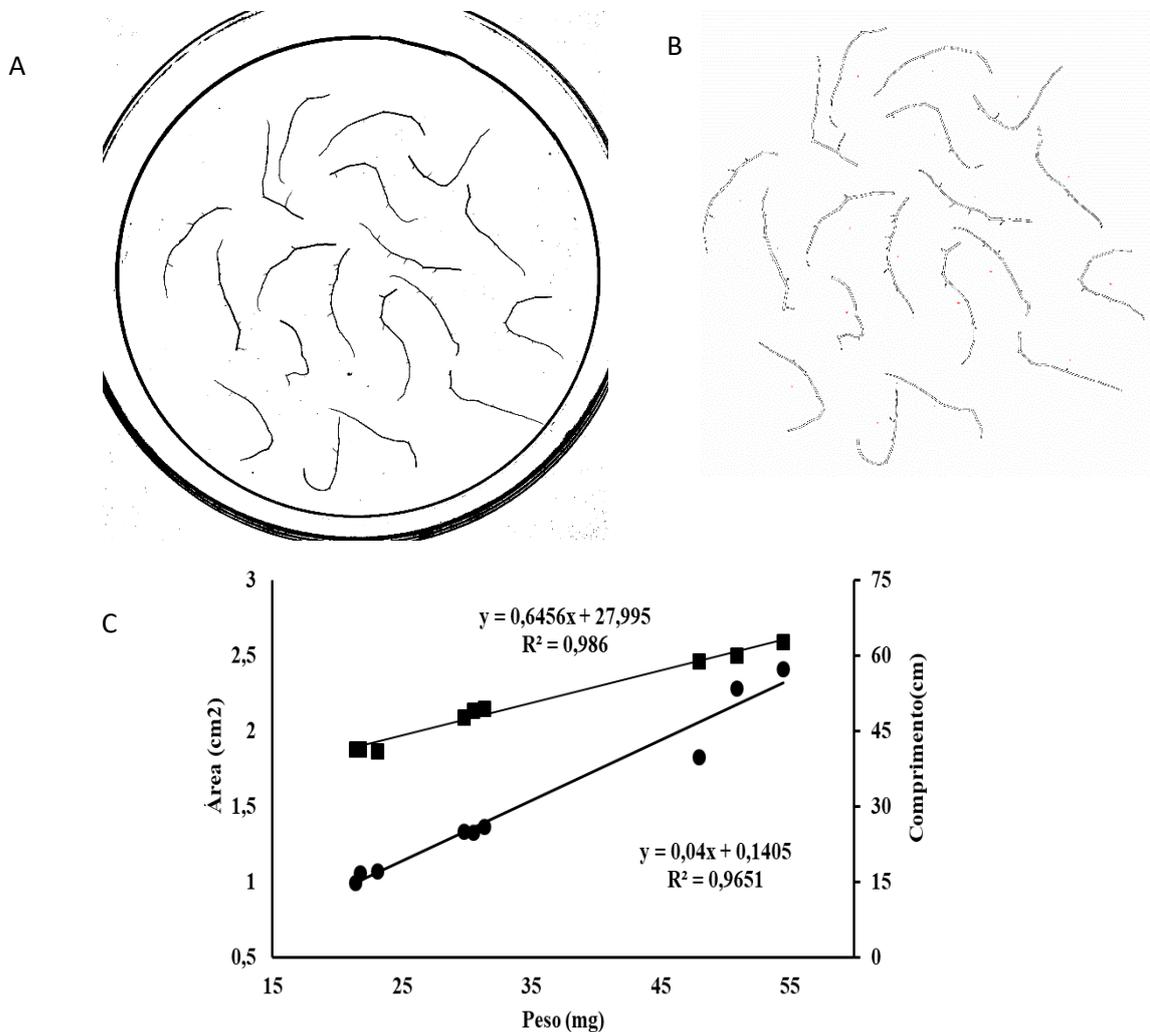


Figura 1.2. Validação do método do crescimento de *Gracilaria tenuistipitata* por imageamento. **A)** Exemplo de processamento de foto de 19 ápices em placa de Petri. **B)** Contornos exatos dos ápices usado para calcular a área e o comprimento dos ápices de forma automática. **C)** Regressão linear de área (●) e comprimento (■) pela massa de 3 medidas ao longo de 7 dias de cultivo. As medidas plotadas são a soma de área, comprimento e peso de todos os ápices (n =3).

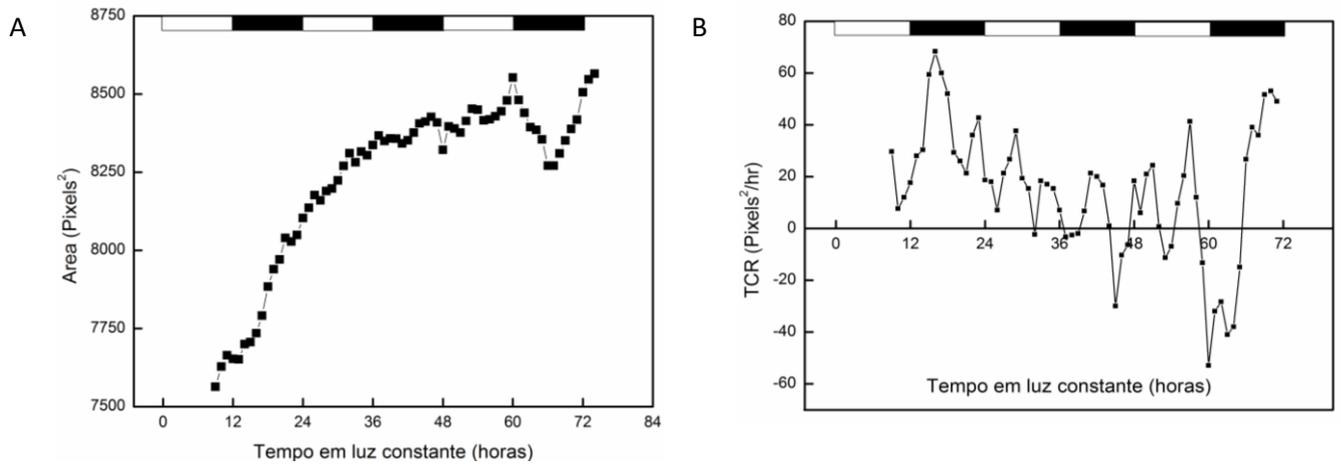


Figura 1.3. Taxa de crescimento relativo (TCR) à área ao longo de 3 dias sob luz constante. **A)** o crescimento bruto da área em pixels atinge o máximo em 48 horas e sofre reduções no começo da última noite subjetiva e volta a subir após 6 horas. **B)** os mesmos valores de A foram usados para calcular a taxa de crescimento a cada 3 horas.

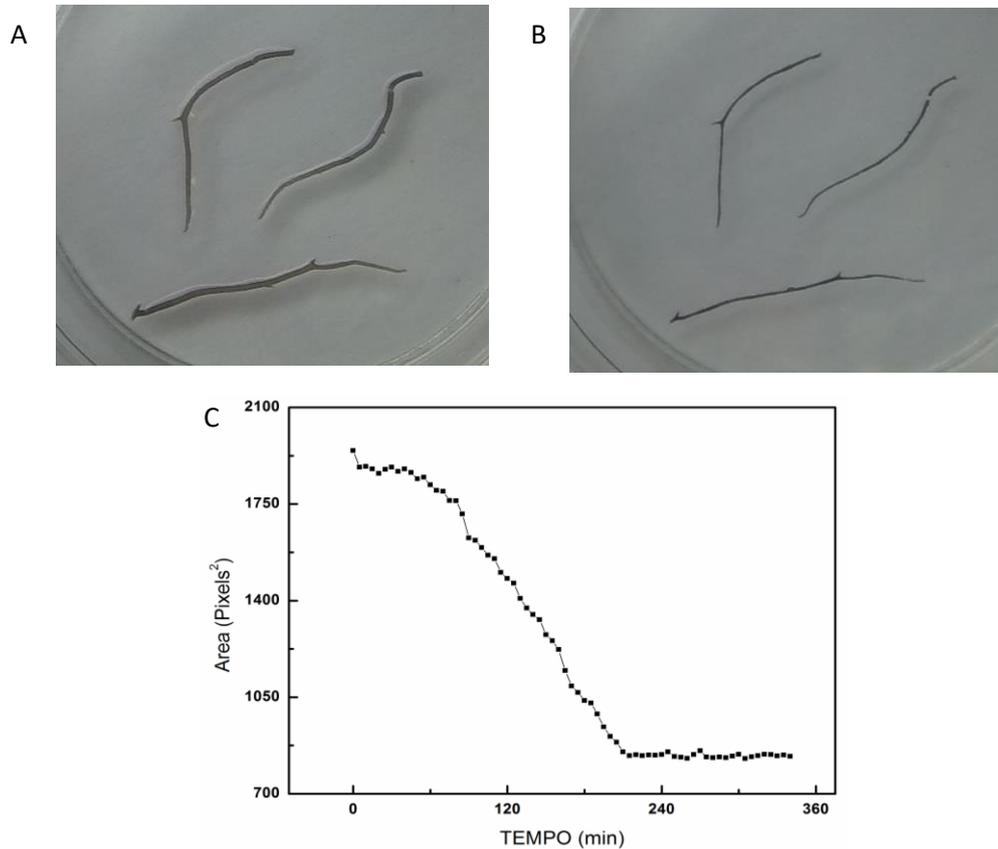


Figura 1.4. Experimento de dessecação de *Gracilaria tenuistipitata* por imageamento. **A)** 3 ápices de 1 cm em placa de Petri onde o meio de cultura foi retirado com pipeta. **B)** Os mesmos ápices após 4 horas, mostrando total desidratação. **C)** Cinética da perda de área em atmosfera de 60%. Em cerca de 1h 40min a dessecação atinge 40% e em 3,5 horas atinge seu limite.

8.2. Efeitos da dessecação na taxa de crescimento

Os ápices foram expostos à umidade da câmara de cultivo em placas de Petri abertas por diferentes períodos correspondendo a várias intensidades de desidratação (Figura 1.5A). Após a dessecação, os talos foram retornados ao meio de cultura para avaliar o impacto da dessecação TCRD e na despigmentação. Houve correlação linear negativa do tratamento com a TCRD, a qual foi reduzida pela metade com 50% de perda de água e quase a zero à 80%, definindo-se a máxima dessecação não letal em 40% (Figura 1.5B). A redução no crescimento foi parcialmente devida à mortalidade dos talos, já que grande parte deles sofreram despigmentação (Figura 1.5C). Nenhum talo despigmentado retornou ao estado normal mesmo após 1 semana de cultivo. Quando este mesmo experimento foi escalonado para expor maior massa à dessecação e seguinte extração de RNA, 40% de perda de água só foi alcançada após 1hr de exposição à mesma atmosfera. Entretanto, assim como no primeiro experimento, este mesmo nível de desidratação não alterou a TCRD ($F = 0,95$; $p = 0,52$) (Figura 1.5D).

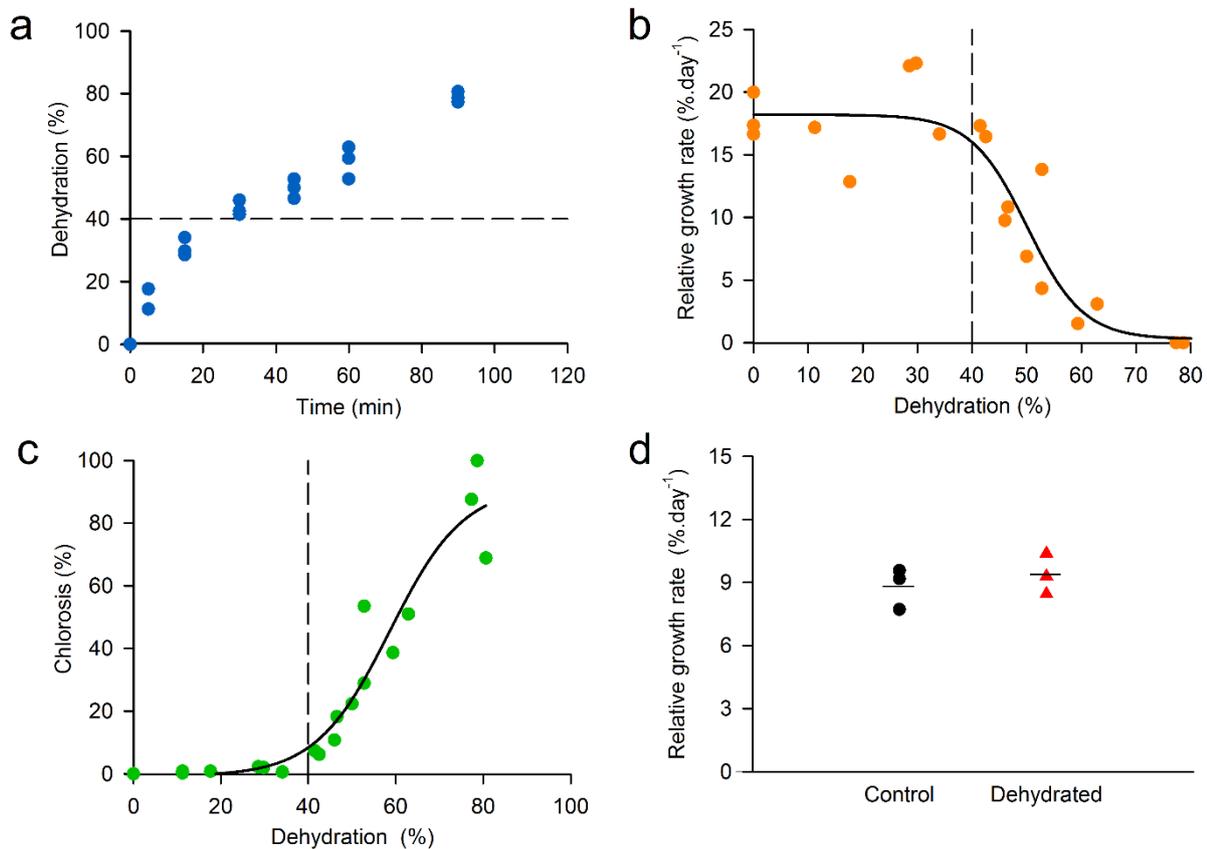


Figura 1.5. A dessecação afeta a taxa de crescimento e morte celular em *Gracilaria tenuistipitata*. **A)** Talos expostos a atmosfera de 60% de umidade por diferentes tempos de incubação e a massa final medida. **B)** Após a dessecação, os talos foram retornados aos cultivos e a TCRD medida após 5 dias. Uma curva de dose-resposta sigmoideal com inclinação variável foi usada para inferir a taxa máxima de dessecação não letal. **C)** Três dias após a desidratação, talos reidratados foram medidos para avaliar o Índice de Despigmentação (Chlorosis). **D)** Outro experimento de 40% de desidratação, também não afetou a TCRD, mesmo usando mais massa para extração de RNA.

8.3. Otimização da extração de RNA

Diferentes métodos de extração de RNA comumente usados para algas foram testados, buscando minimizar o total de biomassa necessária e o tempo de processamento (Tabela B.1). Quatro protocolos diferentes foram testados, a fim de avaliar rendimento, tempo, complexidade e custo: TRIzol Plus RNA Purification System (Thermo Fisher), PureLink Plant RNA Reagent (Thermo Fisher), RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) e o método Tris-Sarkosyl-saline (TSS) (GRECO et al., 2014). TRIzol é uma variedade comercial do método fenol/clorofórmio/isotiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI, 1987) que facilita a

separação do RNA e do DNA por condições ácidas de pH. Purelink é semelhante ao TRIzol, porém não usa fenol. RNeasy usa colunas spin de sílica que se ligam ao RNA em condições desnaturantes. O método TSS usa um tampão de extração altamente salino e alcalino com sarcosil (Lauril sarcosinato de sódio) como surfactante para solubilização dos ácidos nucleicos, desnaturação de nucleases e precipitação de contaminantes como polissacarídeos complexos. Este último também usa separação de fase com clorofórmio e álcool isoamílico, precipitação com isopropanol em presença de 2-mercaptoetanol/acetato de sódio e lavagens exaustivas com etanol a 75%.

O método TRIzol foi mais rápido, fornecendo mínima contaminação por DNA e altos rendimentos de RNA a partir de apenas 25 mg de biomassa fresca (Tabela C.1).

Purelink teve desempenho semelhante, entretanto com grande contaminação por DNA, como mostra a eletroforese em gel de agarose (Figura 1.6). Em seguida da precipitação de RNA, nos dois métodos, DNA contaminante e nucleotídeos traço foram removidos por tratamento com DNase I e centrifugação em colunas de sílica (Qiagen), respectivamente. O método TSS teve o menor rendimento por tempo devido às longas incubações que necessitavam 5 horas no total para finalizar a extração. RNeasy foi o mais simples, porém com baixíssimo rendimento.

Tabela B.1. Detalhes dos protocolos usados. As condições adaptadas/modificadas estão em negrito. O tempo total na última linha é relativo apenas ao tempo de bancada, excluindo-se o tempo de manipulação e o de pulverização das amostras. Siglas: TA – temperatura ambiente. IPA - 2-isopropanol, EtOH - etanol, TE - Tris-EDTA buffer, TE – tampão de extração (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM DTT e 1% sarkosil), IAA – álcool isoamílico, KOAcv – acetato de potássio, NaOAc – acetato de sódio e BME - 2-mercaptoetanol.

Método	TRIZOL	PURELINK	TSS (Greco, 2014)	RNeasy
Homogeneização	Adicionar 10 ml·g ⁻¹ Ressuspender em vortex Incubar a 65°C por 5 min Centrifugar 12000g, 2 min a 4°C	Adicionar 5 ml·g ⁻¹ Ressuspender por vortex Incubar TA por 5 min Centrifugar 12000g, 2 min a 4°C	10 ml·g ⁻¹ Ressuspender por vortex Ressuspender a 10°C por 20min Centrifugar 8100g, por 45s a 4°C	Adicionar 25 µl de 2M DTT a 450 µl de RLT por 100 mg Homogeneizar por vortex Transferir para coluna QIAshredder Centrifugar 8000g, 2 min a TA
Separação de fase	Isolar sobrenadante e adicionar 200 µl HCCl ₃ Agitar 15 vezes na mão e incubar TA 5 min Centrifugar 12000g, 15 min a 4°C	Isolar sobrenadante e Adicionar NaCl + HCCl ₃ (1:3) Centrifugar 12000g, 10 min a 4°C	Adicionar 1/9 de EtOH 100%, 1/4 KOAc 3M Ressuspender por vortex Adicionar 1V HCCl ₃ :IAA (24:1) Ressuspender e Incubar por 30min a 4°C Centrifugar 14200g, 20 min a 4°C Isolar sobrenadante e adicionar 0,3V EtOH 100% Ressuspender vigorosamente e adicionar 1V HCCl ₃ Vortex e Incubar 4°C 20min Centrifugar 14200g, 20min a 4°C	
Precipitação	Isolar sobrenadante e adicionar 0,5V IPA Incubar TA por 10 min Centrifugar 12000g, 10 min a 4°C	Isolar sobrenadante e adicionar 1V IPA Incubar TA por 10 min Centrifugar 12000g, 10 min a 4°C	Isolar sobrenadante e adicionar 0,1 NaOAc, 0,8V IPA e 1% BME Ressuspender por inversão e incubar -80°C por 1 hora Centrifugar 11300g, 30 min a 4°C	Adicionar 200 µl de EtOH 100% ao centrifugado Transferir 650 µl à coluna spin Centrifugar 8000g, 1 min a TA, descartar centrifugado
Lavagem	Descartar sobrenadante e adicionar 1 ml EtOH 75% Centrifugar 7500g, 5 min a 4°C Descartar sobrenadante e adicionar 1 ml EtOH 100% Centrifugar 7500g, 5 min a 4°C Descartar sobrenadante	Descartar sobrenadante e adicionar 1 ml EtOH 75% Centrifugar 12000g, 5 min a 4°C Descartar sobrenadante e adicionar 1 ml EtOH 100% Centrifugar 7500g, 5 min a 4°C Descartar sobrenadante	Descartar sobrenadante e adicionar 1 ml EtOH 75% Centrifugar 11300g, 30 min a 4°C Descartar sobrenadante e adicionar 1 ml EtOH 100% Centrifugar 7500g, 5 min a 4°C Descartar sobrenadante	Adicionar 700 µl de RW1 à coluna spin Centrifugar 8000g, 1 min a TA, descartar centrifugado Adicionar 500 µl de RPE à coluna Spin Centrifugar 8000g 1 min a TA, descartar centrifugado Repetir lavagem com RPE
Secagem	Incubar tubos de cabeça para cima por 5 minutos Incubar tubos de cabeça pra baixo por 5 minutos	Incubar tubos de cabeça para cima por 5 minutos Incubar tubos de cabeça pra baixo por 5 minutos	Incubar tubos de cabeça para cima por 5 minutos Incubar tubos de cabeça pra baixo por 5 minutos	Colocar coluna spin num tubo 2 ml novo Centrifugar 8000g, 1 min a TA, descartar centrifugado
Ressuspensão	Adicionar 50 µl de TE pH 8 Incubar 5 min a 60°C Incubar 2 min a 4°C Centrifugar	Adicionar 50 µl de TE pH 8 Incubar 5 min a 60°C Incubar 2 min a 4°C Centrifugar	Adicionar 50 µl de TE pH 8 Incubar 5 min a 60°C Incubar 2 min a 4°C Centrifugar	Colocar coluna spin num tubo 1,5 ml novo Adicionar 50 µl de TE pH 8 Centrifugar 8000g, 1 min a TA, descartar centrifugado Usar o eluato para repetir último passo
Tempo Total (min)	74	64	243	8

Tabela C.1. Comparação de diferentes métodos de extração de RNA. A eficiência foi medida como a quantidade de RNA puro extraído por miligrama de tecido fresco pelo tempo que cada protocolo necessita. Três pesos iniciais foram testados: 25, 50 e 100 mg. Aqui o tempo considerado engloba processamento das amostras e manuseamento na bancada.

	TRIzol			PureLink			TSS		RNeasy	
Biomassa (mg)	25	50	100	25	50	100	25	100	50	100
Total RNA (μg)	19,6	20,0	8,6	20,6	28,4	41,0	12,4	4,7	1,5	1,7
Concentração ($\eta\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	653,0	400,3	287,4	685,2	947,5	820,1	248,5	93,1	48,8	55,9
Rendimento ($\eta\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	783,6	400,3	86,2	822,2	757,4	410,0	497,1	46,5	29,3	16,8
A₂₆₀/A₂₃₀	2,3	2,1	1,8	2,0	1,8	0,6	2,3	2,1	0,8	0,6
A₂₆₀/A₂₈₀	2,2	2,2	2,2	2,3	2,1	2,3	2,0	2,0	2,2	2,2
Tempo (h)	1,5			1,5			5		0,6	
Rendimento ($\eta\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	522,4	266,9	57,5	548,1	504,9	273,4	99,4	9,3	46,5	26,6

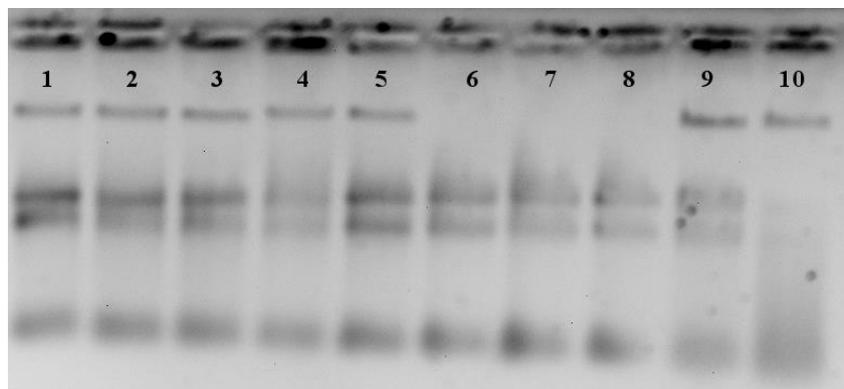


Figura 1.6. Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando RNA extraído de *Gracilaria tenuistipitata* com diferentes protocolos. Os poços **1-5, 9 e 10** são extratos preparados com o método Purelink (100 mg **1-3**; 50 mg **4-5** e 25 mg **9-10**), poços **6-7** possuem RNA extraído com TRIzol. A primeira banda mostra o DNA genômico que está presente em todas amostras do Purelink e em nenhuma TRIzol. As bandas seguintes são os RNA ribossômicos 18S e 28S. Todas amostras foram carregadas no gel antes do tratamento com DNase I. Em todos poços 1,5 μg de RNA foi colocado. A eletroforese ocorreu por 15 min a 110V.

O controle negativo da reação de RT-qPCR não mostrou curva de amplificação (Figura 1.7A) assim como o RNA não tratado com DNase I, extraído com o protocolo TRizol. Obteve-se regressão linear com $R^2=0,99$ e eficiência 100% para o gene NIA2 (Figura 1.7B), confirmando definitivamente a pureza do RNA extraído.

8.4. Seleção dos genes de normalizadores

Dentre os 12 genes escolhidos, nove foram selecionados como normalizadores (Tabela A.1) com base em trabalhos similares para algas vermelhas (HO, 2009; KONG et al., 2014; LE BAIL et al., 2008; WU, 2009, 2013). A seleção da melhor combinação com menor número de genes foi feita a partir do software geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). Neste método, uma variável, "M", para estabilidade em determinado tratamento é gerada para grupos com decrescente quantidade de genes (Figura 1.8B). Os grupos foram gerados usando uma exclusão par a par de genes que levassem a um maior M. Com este critério o gene menos estável nesse experimento foi da proteína ribossomal subunidade 60S L51 (RPL51, $M = 1,63$) e os genes mais estáveis foram β -GALACTOSIDASE B e TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR IIB (GLB e GTF2B, $M = 0,68$) (Figura 1.8A).

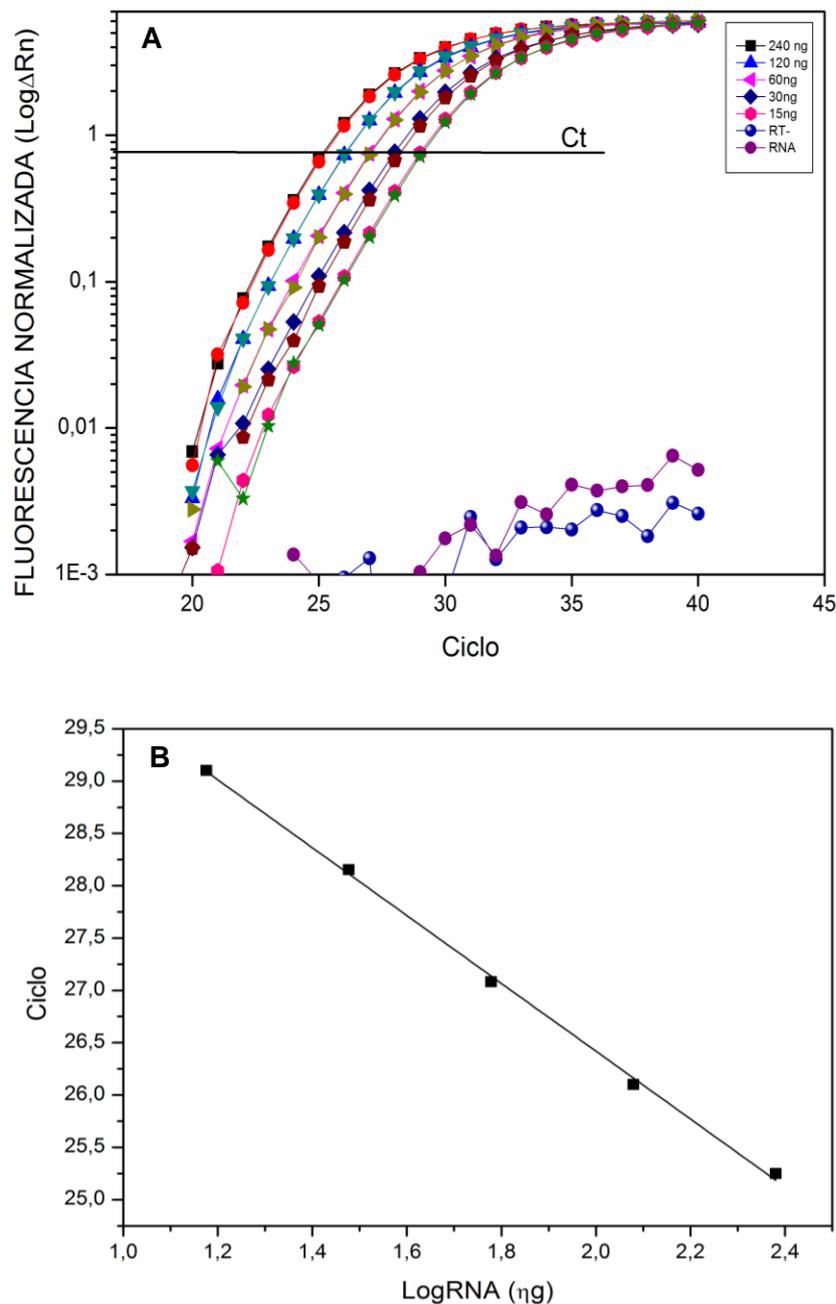


Figura 1.7. Confirmação por RT-qPCR do gene NIA2 da pureza do RNA de *Gracilaria tenuistipitata* extraído com protocolo TRIzol (n = 2 para cada gene). **A)** Curva de diluição (1:2) da amplificação com 240 ng de RNA iniciais (n = 2). RT⁻ representa reação sem transcriptase reversa e “RNA” representa RNA não tratado com DNase I, mostrando que não existe quantidade significativa de DNA na amostra de RNA extraída com TRIzol. **B)** Curva de eficiência da amplificação, com R² de 0,99 e eficiência de 103,47%. Detectou-se até 15 ng de RNA em 20 μ l de reação. Eficiência próxima de 100% demonstra a inexistência de inibidores da amplificação.

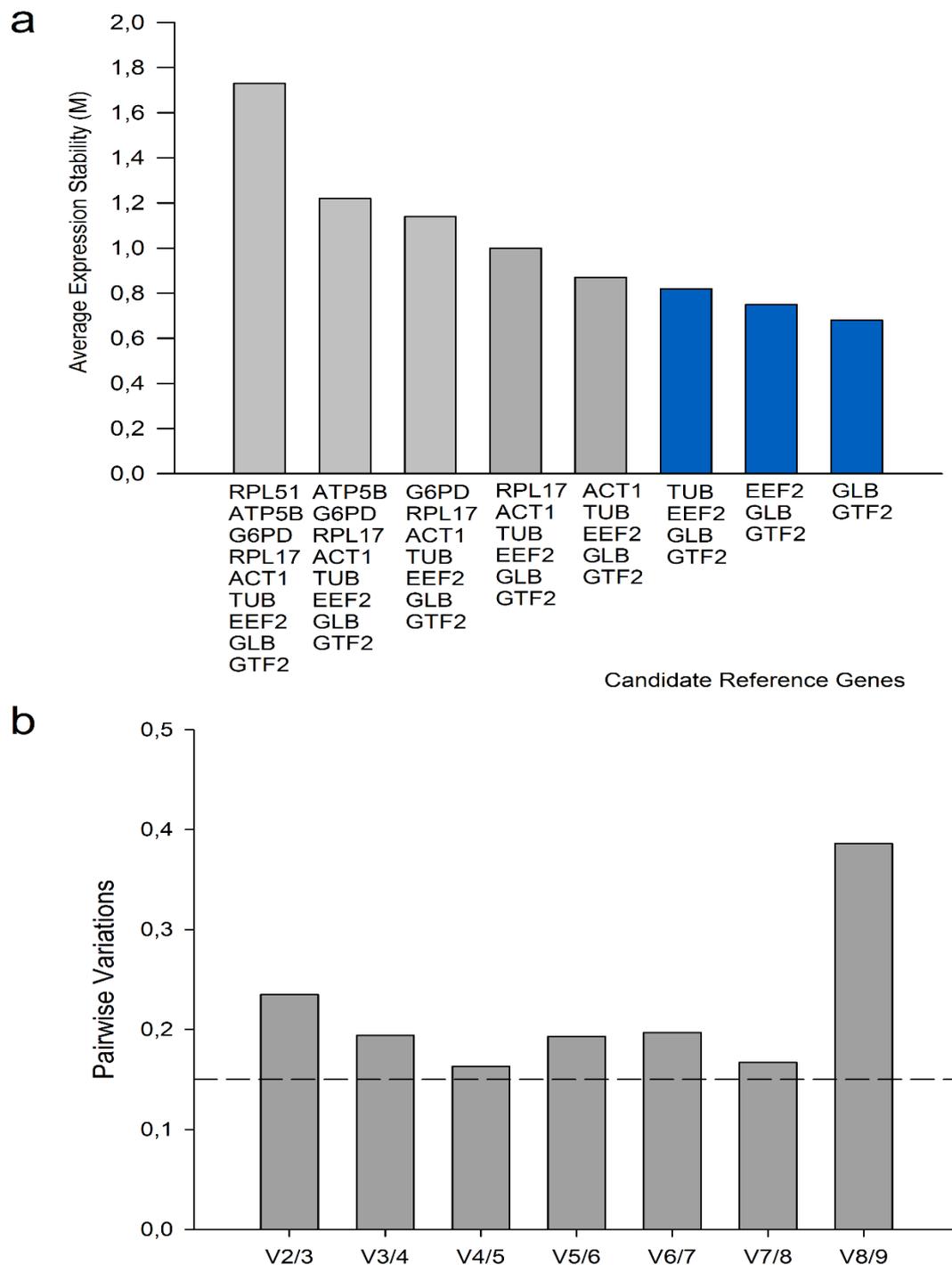


Figura 1.8. Validação dos 9 genes candidatos à referência selecionados pelo geNorm em *Gracilaria tenuistipitata*. A) A estabilidade de expressão (M) em todas amostras testas após exclusão par-a-par dos genes menos estáveis. As combinações mais estáveis estão em azul. B) Variação par-a-par de todas amostras testas. No eixo x é plotada as combinações descritas em **A**, combinadas par-a-par. A linha tracejada representa o valor de corte sugerido de 0,15. O valor da combinação menos variável foi de 0,163 pelos genes GLB, GTF2, EEF2 e TUB.

O número ideal de genes de referência usados para normalização da expressão pelo método $\Delta\Delta C_t$ foi obtido pela variação par-a-par entre fatores de normalização de dois grupos de genes diferindo no número de genes de referência ($V_{n/n+1}$). Escolheu-se a combinação de 3 genes: GTF2, GLB, EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR 2 (EEF2) e β -TUBULIN (TUB), que demonstrou variação par-a-par de 0,168.

8.5. Níveis de transcritos sob dessecação

A média geométrica dos valores de C_t dos três genes mais estáveis foi usada com fator de normalização, a fim de medir os níveis de expressão dos três genes: THIOREDOXIN (TRX), OXYGEN-EVOLVING ENHANCER 1 (OEE) e NITRATE REDUCTASE 2 (NIA2) em resposta a 1h de dessecação, que levou a uma perda de 40% do peso em água (Figura 1.5D). Apesar de nenhuma mudança na TCRD ter sido observada, os níveis dos transcritos de TRX foram 8x mais altos em talos desidratados que nos controles (Figura 1.9A). Durante as seguintes 4h de reidratação, houve uma tendência de 2x mais transcritos TRX nos tratados que no controle. Em contraste, os níveis dos transcritos de OEE1 reduziram lentamente até as 4h, onde reduziram para 2x menos que o controle (Figura 1.9B) e NIA2 mostrou uma forte redução de seus níveis transcricionais durante a dessecação, que se recuperou lentamente até 4h após a dessecação (Figura 1.9C).

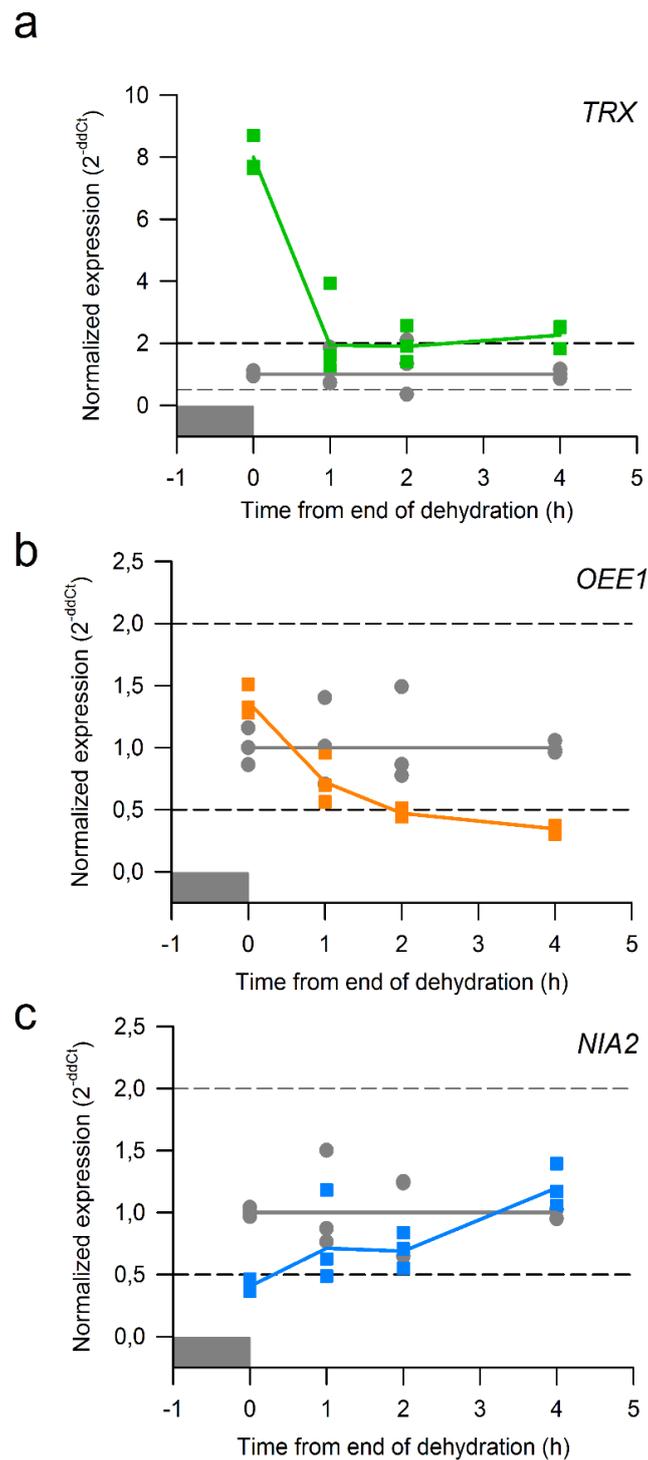


Figura 1.9. Quantificação dos transcritos após dessecação (0h) e durante reidratação (1,2 e 4h) em *G. tenuistipitata*. As barras horizontais cinzas no eixo X representam o tempo que os talos foram secos à atmosfera de 60% de umidade por 1h. A RT-qPCR foi normalizada pela média geométrica dos CTs dos genes GLB, GTF2, EEF2 e TUB. **A** – TRX se mostrou superexpresso assim que a dessecação cessou, mantendo níveis normais até o fim das medições. **B e C** – A quantidade de transcritos de OEE1 e NIA2 não muda com o tratamento. As linhas tracejadas representam os níveis corte de expressão considerados significativos, sendo menores que 0,5x como subexpressos e maiores que 2x como super-expressos. A linhas sólidas cinzas representam a média das réplicas biológicas das amostras controle. Quadrados coloridos representam amostras desidratadas. Foram feitas triplicatas para todos genes.

9. DISCUSSÃO

Nesse capítulo, buscou-se avaliar como a fisiologia de *Gracilaria tenuistipitata* oscila em condições de livre curso e quais são as respostas transcricionais ao estresse hídrico. Para tanto, parâmetros fisiológicos foram medidos em séries temporais sob luz constante para observar oscilações circadianas e em seguida, respostas transcricionais ao déficit hídrico foram avaliadas.

O relógio circadiano de eucariotos fotossintetizantes já foi visualizado pela medição da fotossíntese e taxa de divisão celular (GOULD et al., 2009; NOORDALLY, 2013; SCHUBERT, 2004), onde a oscilação de parâmetros fisiológicos foi mantida mesmo em condições de livre curso (luz e temperatura constantes). Sob estas mesmas condições a fotossíntese de *G. tenuistipitata* medida por *Delayed Fluorescence*, demonstrou o mesmo comportamento. Vale ressaltar que uma tendência de adiantamento de fase já foi descrito em *Kappaphycus alvarezii* e *Gracilaria birdiae* (ALVES-LIMA, 2012; SCHUBERT et al., 2004), fato também verificado para *G. tenuistipitata* (Figura 1.1).

Estudos anteriores também já haviam descrito ritmos em algas vermelhas ao realizar o imageamento automático do crescimento (LÜNING, 1992). Essa técnica permite a automatização da medida da taxa de crescimento, tornando-a mais sensível a mudanças inferiores a 3 horas e possibilitando a fenotipagem individual de talos de tamanho reduzido. Constatou-se uma correlação linear significativa entre medidas de área e comprimento com medidas de peso em *G. tenuistipitata* (Figura 1.2). Dessa forma, foi possível medir automaticamente mudanças de fase no crescimento circadiano sob diferentes intensidades e qualidade de estresses, como dessecação (Figura 1.3).

Paralelamente, mediu-se contração rítmica dos talos de *G. tenuistipitata* ao longo do dia (Figura 1.3). Este comportamento já foi descrito para outras rodófitas como *Porphyra umbilicalis* e *P. leucosticata* (ESCASSI, 2002; LÜNING, 1992). A diminuição de K^+ intracelular durante a noite, pode causar saída de água e consequente perda de turgor e contração dos talos de forma cíclica, independente da concentração deste nutriente no meio. A regulação do comportamento de alargamento/contração reversível pode ser feita diretamente em canais de K^+ que aumentam a assimilação de K^+ e Cl^- o que muda o potencial hídrico das células e permite seu alargamento por incorporação de água (ESCASSI et al., 2002). Fitocromos já foram associados como os fotorreceptores responsáveis pela sinalização de sinais de luz aos canais de potássio (KIM, 1993), os quais possuem oscilação de 24hrs sob luz constante (HAYDON, 2011). Este mecanismo é muito similar àquele que explica os movimentos foliares circadianos de *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa pudica* (ENGELMANN, 1998; KIYOSAWA, 1976; KOUKKARI, 2007; MOSHELION, 2002; SOLHEIM, 2009), efeito independente da oscilação diária da taxa de crescimento em plantas (APELT et al., 2017).

Estabeleceu-se, portanto, ferramentas precisas e automáticas para a determinação de ajustes no perfil circadiano de parâmetros fisiológicos como crescimento e fotossíntese de *Gracilaria tenuistipitata*, além de tornar possível a avaliação cinética da desidratação sob diferentes condições.

Experimentos de desidratação in vitro já foram previamente reportados para algumas plantas vasculares como *Aloina ambigua* e *Arabidopsis thaliana* (BRINDA, 2016; DING, 2012) e alguns em algas vermelhas como *Gracilaria corticata*, *G. tikvahiae*, *Stictosiphonia arbuscular*, *Pyropia haitensis* e *Porphyra columbina* (BURRITT, 2002; CONTRERAS-

PORCIA, 2011a; KUMAR, 2010; QIAN, 2014; ZOU, 2011). Experimentos in loco foram importantes para determinar quais parâmetros naturais contribuem para as respostas fisiológicas, molecular e bioquímicas à seca (ABE et al., 2001; LIU et al., 2014; LÓPEZ-CRISTOFFANINI, 2015; SAMPATH-WILEY, 2008).

Este estudo permite classificar *G. tenuistipitata* como uma espécie moderadamente tolerante ao déficit hídrico, mas não tolerante à dessecação, onde, na mais recente classificação, organismos devem reestabelecer a homeostase basal durante a reidratação após perda de água de no mínimo 80% (ALPERT, 2005; BOHNERT, 2000; GECHEV, 2012; HOEKSTRA, 2001; OLIVER, 2000). Como esta espécie pode ser encontrada em poças de mesolitoral, ambiente onde há grande variabilidade de condições ambientais, até mesmo uma tolerância moderada à escassez de água pode ser uma vantagem adaptativa muito importante (WANG et al., 2014). *G. tenuistipitata* é mais tolerante à dessecação que outras espécies do mesmo gênero, como *G. corticata* (KUMAR, 2011b) e *G. tikvahiae* (HODGSON, 1984), mas não tão tolerante como espécies do gênero *Pyropia* e *Porphyra*, que são consideradas plantas extremamente tolerantes à dessecação (ressurrection plants), recuperando-se mesmo após perda de 90% de seu conteúdo de água (CONTRERAS-PORCIA, 2011b; QIAN et al., 2014).

O estresse hídrico é o maior regulador da transcrição em plantas (GOLLDACK, 2011; ZHOU, 2014). Entretanto, a quantificação de transcritos de algumas espécies de algas vermelhas frequentemente é subestimada pelo baixo rendimento das extrações de RNA, mesmo usando kits para plantas ricas em carboidratos. A forma mais simples de combater tal problema é aumentar a biomassa inicial, o que nem sempre é viável, dependendo da configuração do experimento. Devido a isso, buscou-se um protocolo de extração de RNA

usando mínimas quantidades de tecido. Em *G. tenuistipitata*, cerca de 90% do peso fresco é composto por água, 9% carboidratos complexos extracelulares e 1% tecidos (ISRAEL, 1999). Estes polissacarídeos podem co-precipitar com os ácidos nucleicos, entupir colunas de sílica frequentemente usadas na extração de RNA e também possuem radicais que podem absorver comprimentos de onda de 220 nm à 280 (ARAKI, 1956), sub-estimando a concentração final do RNA e/ou super-estimando a contaminação na espectrofotometria.

Dado isso, procurou-se aqui estabelecer métodos mais viáveis para quantificação circadiana de transcritos de *G. tenuistipitata*. O método TRIzol modificado, foi superior e demonstrou altos índices de rendimento, além de ser mais rápido e eficiente, possibilitando múltiplas bateladas de extração em um único dia (Tabela C.1). Métodos descritos anteriormente (FALCÃO et al., 2008; GRECO et al., 2014) não foram eficientes para pouca biomassa inicial, já que exigiam longas incubações que poderiam levar até um dia inteiro para apenas poucas amostras. RNeasy forneceu o menor rendimento, devido à menor capacidade de ligar a sílica ao RNA, devido a entupimento provavelmente por ágar. O método Purelink foi comparável ao TRIzol, porém exibiu grande quantidade de DNA contaminante, o que exige longas incubações com DNase I. O fato do pH do Purelink ser mais alto que o do TRIzol pode ter contribuído para a co-precipitação de RNA e DNA. Este estudo recomenda a utilização do Método TRIzol modificado (Tabela C.1) seguido de tratamento com DNase I e finalmente purificação com colunas de sílica, após a retirada de grande parte de contaminantes e DNA. Este protocolo aumentou em 15,7x o rendimento quando comparado ao último protocolo desenvolvido no próprio laboratório (FALCÃO et al., 2008) e permitiu que a RT-qPCR foi definitivamente estabelecida (Figura 1.5). Além disso, desenvolveu-se e validou-se primers para 4 genes normalizadores e 1 marcador de estresse de dessecação (Figura 1.9) de *Gracilaria tenuistipitata*.

Outro desafio para a quantificação de transcritos é a seleção de múltiplos genes de referência para se usar no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK, 2001), fato muitas vezes negligenciado. Neste método, os níveis transcricionais de um grupo de genes que se mantêm estáveis durante um tratamento são considerados como referência e usados para normalizar os dados. Poucos genes foram normalizados para tratamento de algas vermelhas sob dessecação (KONG et al., 2014; WU et al., 2012), mas nenhum no gênero *Gracilaria*. Muitos estudos afirmam que cada experimento precisa ter seu próprio grupo de genes estáveis validado e testado, já que o uso de normalizadores clássicos, como GAPDH e ACT, podem variar devido à muitos fatores, como hora do dia, tecido, desenvolvimento e cultura (ARTICO, 2010; KOWALCZYK et al., 2014; LE BAIL et al., 2008). Este trabalho propõe a avaliação de genes de referência já estudados em outras rodófitas, além de propor novas sequências de primers desenhados especificamente para RT-qPCR, baseado no banco de EST de *G. tenuistipitata*. Dentre esse grupo de genes escolhidos, o software geNorm escolhe a combinação mais estável e menos variável, programa amplamente utilizado para este tipo de estudo (KOZERA et al., 2013; PFAFFL, 2001; VANDESOMPELE et al., 2002).

A escolha de genes de referência é uma tarefa complexa e depende da estabilidade dos genes usados e da variação entre cada tratamento, assim é impossível definir genes globais que funcionem para qualquer tipo de experimento em um organismo (VANDESOMPELE et al., 2002). Visando facilitar esta análise, o geNorm propõe o cálculo dos parâmetros M e $V_{n/n+1}$ para definição da melhor combinação de genes estáveis dentro de um tratamento. A melhor combinação teve $M = 0,68$ e a menor variação obtida foi com 4 genes, com variação par-a-par de 0,168 (Figura 1.8B). Estes resultados mostram índices maiores que os valores de corte, fato já descrito em muitos outros trabalhos (ARTICO et al., 2010; JIANG, 2014; KONG et al., 2014; ROSIC, 2011; TIAN, 2015). O artigo original do

software GeNorm demonstra o uso de variáveis semelhantes de estabilidade, mas mesmo assim estes genes foram usados em uma normalização posterior (EDSJÖ, 2004; VANDESOMPELE, 2003).

Os quatro genes de referência foram selecionados para experimentos de dessecação em *G. tenuistipitata* foram GLB, EEF2, GTF2B e TUB. Estes genes regulam processos básicos de homeostase, como transcrição (GTF2B), tradução (EEF2), degradação de polissacarídeos (GLB) e do ciclo celular (TUB) e não demonstraram variações significativas sob desidratação moderada. Em *Cicer arietinum* e *Medicago truncatula*, GTF2B e GLB foram superexpressos em resposta à dessecação, o que pode sinalizar um remodelamento da parede celular (BRAY, 2004; HARB, 2010; TENHAKEN, 2015) ou a mobilização de polissacarídeos para diminuir o dano pela cristalização de moléculas em ambientes anídricos (INGRAM, 1996; MOLINA, 2008; ZHANG, 2014). Sob diferentes estresses a expressão de genes de *Porphyra* se comporta similarmente, com EEF2 como gene estável e TUB extremamente induzido (KONG et al., 2014).

Uma das estratégias utilizadas para evitar morte celular causada por desidratação é a expressão de genes que forneçam proteção contra danos redox. Assim, o aumento dos níveis transcricionais de TRX fazem parte deste mecanismo. O que também foi verificado neste estudo (Figura 1.9). TRX reduz as ligações dissulfeto entre cisteínas, como em peroxiredoxinas, a qual reduz os níveis de peróxido de hidrogênio (HALL, 2011; HOLMGREN, 1985). TRX também é superexpressa em cevada, batata e *Arabidopsis* sob estresse hídrico (BROIN, 2000; CHA, 2014; WANG, 2015), mas teve níveis mais baixos em feijão (ZADRAŽNIK, 2013).

Também foi mostrado que os níveis transcricionais de OEE1 lentamente caem em resposta à dessecação (Figura 1.9B). OEE1 é um componente do complexo liberador de oxigênio (Oxygen Evolving Complex) do fotossistema II, por isso foi usado como indicador do estado do aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata* após a dessecação e durante a reidratação. Esta redução lenta na expressão, significativa apenas 4 dias depois, pode ter sido devida a um efeito não detectado de morte celular, em vez de resposta a um mecanismo regulatório. Não há um padrão na resposta à dessecação de OEE1, já que ele manteve níveis altos em cevada e trigo durante estresse de hídrico e estresse salino em mangue (AGRAWAL, 2015; JIANG, 2012; SUGIHARA, 2000). Contrariamente, o mesmo gene teve baixos níveis transcricionais em trigo e feijão sob desidratação (AGHAEI, 2008; GAO, 2011) e teve variação na expressão dependente de linhagem em feijão e milho sob déficit hídrico (BENEŠOVÁ, 2012; ZADRAŽNIK et al., 2013).

O gene NIA2 foi usado como indicador transcricional da assimilação de nitrogênio. NIA2 teve baixos níveis 1 hora após a desidratação, de forma rápida, como TRX. Esta resposta à dessecação é comumente encontrada em plantas (FERRARIO-MÉRY, 1998; FOYER, 1998; GOEL, 2015) apesar de em trigo ter sido superexpresso (FRESNEAU, 2007).

Estudos transcricionais em rodófitas têm mostrado que diversos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico são evolutivamente conservados, apesar de possuírem variação entre linhagens e métodos de indução de dessecação. Algas vermelhas, como *G. tenuistipitata*, podem ser comparadas com plantas terrestres visando entender como estes mecanismos surgiram, já que Rhodophyta é o grupo de eucariotos fotossintetizantes multicelulares mais antigo.

Em suma, quatro técnicas (imageamento semiautomático de crescimento e dessecação, delayed fluorescence, extração de RNA de baixa biomassa e RT-qPCR) foram padronizadas e exploradas buscando avaliar respostas fisiológicas e rítmicas dos efeitos da dessecação sobre o relógio biológico de *Gracilaria tenuistipitata*.

G. tenuistipitata já se mostrou com excelente modelo de laboratório devido ao seu crescimento rápido, grande tolerância a estresses e fácil manutenção e manuseamento e baixo requerimento nutricional. Assim, este trabalho propõe também que seja usado para descobrir novas respostas do relógio ao estresse abiótico em Rhodophyta.

O conhecimento do comportamento do relógio já se mostrou essencial para o estabelecimento e seleção de organismos para o cultivo, dada sua significativa influência no acúmulo de biomassa e reprodução. A dessecação pode influenciar negativamente no crescimento de diversas espécies de algas vermelhas e os genes do relógio biológico podem ser um alvo para busca de linhagens mais tolerantes.

O estresse hídrico pode estar envolvido com diversos mecanismos de tolerância. Os principais são estão relacionados à tolerância por temperatura e salinidade. *G. tenuistipitata* é uma alga eurihalina, o que pode estar relacionado com sua grande presença em poças em ambientes de meso-litoral. Na China, é considerada um bioinvasor (WANG et al., 2014), o que dá ainda mais a importância do seu estudo, visando um manuseio correto.

Este trabalho estabelece vários passos importantes em direção à compreensão da fisiologia molecular de algas vermelhas, sobretudo algas agarófitas, muito importantes no crescimento da aquicultura global (BRODIE, 2017) e ainda pouco estudadas no Brasil.

10. CONCLUSÃO

Confirma-se a hipótese de que *Gracilaria tenuistipitata* possui ritmos circadianos. Isso foi possível através da adaptação de métodos de imageamento e fotossíntese para avaliar a fisiologia de *G. tenuistipitata*. Oscilações circadianas na expansão/contração dos talos e na fluorescência da clorofila foram detectadas pela primeira vez no gênero *Gracilaria* e indicam que relógio circadiano regula, de forma semelhante às plantas terrestres, a fotossíntese e o desenvolvimento de Rhodophyta. Devido a isso, sugere-se um oscilador bioquímico circadiano central, similar ao relógio descrito em *O.tauri*, deve existir em rodófitas, porém carece de detalhamento. A hipótese de que *G.tenuistipitata* seria tolerante à dessecação foi negada já que a partir de 40% de perda de água há significativa diminuição do crescimento. Entretanto, houve apenas mudança significativa na expressão de TRX imediatamente após a dessecação e, após 4 horas, os três genes testados (TRX, OEE1 e NIA2) apresentavam níveis normais de expressão. Para obter tal resultado, estabeleceu-se a combinação de 4 genes normalizadores (GLB, GTF2, EEF2 e TUB), dentro de 9 comumente usados, para calcular os níveis relativos de transcritos sob estresse hídrico. Estes resultados permitirão verificar a influência do estresse hídrico sob a oscilação circadiana da expressão gênica, fotossíntese e crescimento de *G.tenuistipitata*. Os métodos descritos e padronizados neste estudo serão de grande importância para o entendimento das interações de fatores abióticos com o oscilador central, o que pode revelar mecanismos relacionados à reprodução e desenvolvimento em macroalgas vermelhas. Portanto, *G. tenuistipitata* foi, mais uma vez, um excelente modelo para buscar respostas moleculares e fisiológicas dentro do grupo Rhodophyta.

11. REFERENCIAS

- ABE, S. et al. The cellular ability of desiccation tolerance in japanese intertidal seaweeds. **Botanica Marina**, v. 44, n. 2, p. 125–131, 27 jan. 2001.
- AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A. A.; KOMATSU, S. Proteome analysis of potato under salt stress. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 4858–4868, 2008.
- AGRAWAL, G. K. et al. Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns grown under different drought conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 479, p. 1–18, 2015.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integr. Comp. Biol.**, v. 45, p. 685–695, 2005.
- ALVES-LIMA, C. **Ritmos circadianos em *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta): oscilação do desempenho fotossintético e caracterização enzimática da nitrato redutase.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.
- APELT, F. et al. Circadian, Carbon, and Light Control of Expansion Growth and Leaf Movement. **Plant Physiology**, v. 174, p. 1949–1968, 2017.
- ARAKI, C. Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 29, p. 543–544, 1956.
- ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 3, p. 231–243, maio 1995.
- ARTICO, S. et al. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC plant biology**, v. 10, p. 49, jan. 2010.
- BARUFI, J. B. et al. Life history, morphological variability and growth rates of the life phases of *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta: Gracilariales) in vitro. **Scientia Marina**, v. 74, n. 2, p. 297–303, 16 mar. 2010.
- BENEŠOVÁ, M. et al. The physiology and proteomics of drought tolerance in Maize: Early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–17, 2012.
- BOHNERT, H. J. What makes desiccation tolerable? **Genome biology**, v. 1, n. 2, p. 4, 2000.
- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 407, p. 2331–41, nov. 2004.
- BRINDA, J. C. et al. Embryos of a moss can be hardened to desiccation tolerance: effects

of rate of drying on the timeline of recovery and dehardening in *Aloina ambigua* (Pottiaceae). **Annals of botany**, v. 117, n. 1, p. 153–63, 1 jan. 2016.

BRODIE, J. et al. The algal revolution. **Trends in plant science**, v. 22, n. 8, p. 726–738, 2017.

BROIN, M. et al. Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. **FEBS Letters**, v. 467, p. 245–248, 2000.

BURRITT, D. J.; LARKINDALE, J.; HURD, C. L. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. **Planta**, v. 215, n. 5, p. 829–38, set. 2002.

CARPENTER, A. E. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. **Genome biology**, v. 7, n. 10, p. R100, 31 jan. 2006.

CHA, J.-Y. et al. NADPH-dependent thioredoxin reductase A (NTRA) confers elevated tolerance to oxidative stress and drought. **Plant physiology and biochemistry**, v. 80, p. 184–91, jul. 2014.

CHOI, S. et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of the gametophyte thalli of *Pyropia tenera* under normal and high temperature conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 1237–1246, 21 out. 2012.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, abr. 1987.

COLLÉN, J. et al. An expressed sequence tag analysis of thallus and regenerating protoplasts of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyceae). **Journal of Phycology**, v. 42, p. 104–112, 2006a.

COLLÉN, J. et al. Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) after exposure to methyl jasmonate. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 14, p. 3869–81, jan. 2006b.

COLLÉN, J. et al. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 13, p. 5247–52, 26 mar. 2013.

COLLÉN, J.; DAVISON, I. R. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 9, p. 1143–1151, 1999.

COLLÉN, P. N. et al. Analysis of expressed sequence tags from the agarophyte *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 641–647, 4 maio 2011.

CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 6, p. 1815–29, mar. 2011a.

CONTRERAS-PORCIA, L. et al. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 6, p. 1815–29, 1 mar. 2011b.

COSTA, E. S. et al. The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil—a DNA barcoding approach. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1643–1653, 6 maio 2012.

CRUZ DE CARVALHO, M. H. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. **Plant signaling & behavior**, v. 3, n. 3, p. 156–65, mar. 2008.

DING, Y. et al. Selection of reference gene from *Gracilaria lemaneiformis* under temperature stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1365–1372, 31 out. 2014.

DING, Y.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in Arabidopsis. **Nature communications**, v. 3, p. 740, 13 jan. 2012.

EDSJÖ, A. et al. Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 84, n. 4, p. 406–17, abr. 2004.

ENGELMANN, W.; ANTKOWIAK, B. Ultradian rhythms in *Desmodium*. **Chronobiology international**, v. 15, n. 4, p. 293–307, jul. 1998.

ESCASSI, L. et al. Potassium drives daily reversible thallus enlargement in the marine red alga *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta). **Planta**, v. 214, n. 5, p. 759–66, mar. 2002.

FALCÃO, V. R. et al. RNA Isolation method for polysaccharide rich algae : agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 1, p. 9–12, 2008.

FERRARIO-MÉRY, S.; VALADIER, M.-H.; FOYER, C. H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Physiology**, v. 117, p. 293–202, 1998.

FERREIRA, L. B.; BARUFI, J. B.; PLASTINO, E. M. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 1, p. 187–192, mar. 2006.

FOYER, C. et al. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant physiology**, v. 117, n. 1, p. 283–92, maio 1998.

FRESNEAU, C.; GHASHGHAIE, J.; CORNIC, G. Drought effect on nitrate reductase and

sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): Role of leaf internal CO₂. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 11, p. 2983–2992, 2007.

GAO, L. et al. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). **Phytochemistry**, v. 72, p. 1180–1191, 2011.

GECHEV, T. S. et al. **Molecular mechanisms of desiccation tolerance in resurrection plants** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012.

GOEL, P.; SINGH, A. K. Abiotic stresses downregulate key genes involved in nitrogen uptake and assimilation in *Brassica juncea* L. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143645, jan. 2015.

GOLLDACK, D.; LÜKING, I.; YANG, O. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. **Plant cell reports**, v. 30, n. 8, p. 1383–91, ago. 2011.

GOULD, P. D. et al. Delayed fluorescence as a universal tool for the measurement of circadian rhythms in higher plants. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 58, n. 5, p. 893–901, jun. 2009.

GRANBOM, M. et al. Nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): Oscillation due to the protein level. **Botanica Marina**, v. 50, n. 2, p. 106–112, 2007.

GRECO, M. et al. A simple and effective method for high quality co-extraction of genomic DNA and total RNA from low biomass *Ectocarpus siliculosus*, the model brown alga. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e96470, jan. 2014.

GUENTHER, R. J.; MARTONE, P. T. Physiological performance of intertidal coralline algae during a simulated tidal cycle. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 310–321, 12 abr. 2014.

HAGLUND, K.; PEDÉRSÉN, M. Growth of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* at high pH. Influence of some environmental factors and correlation to an increased carbonic-anhydrase activity. **Botanica Marina**, v. 35, p. 579–587, 1992.

HALL, A. et al. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 3, p. 795–815, 1 ago. 2011.

HAMMAD, S. A. R.; ALI, O. A. M. Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 1, p. 133–145, jun. 2014.

HARB, A. et al. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1254–1271, 31 ago. 2010.

HAYDON, M. J.; BELL, L. J.; WEBB, A. A. R. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 7, p. 2333–2348, 1 abr.

2011.

HO, C.-L. et al. Profiling the transcriptome of *Gracilaria changii* (Rhodophyta) in response to light deprivation. **Marine biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 513–9, 2009.

HODGSON, L. M. Desiccation tolerance of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 20, n. 3, p. 444–446, set. 1984.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Ann. Rev. Biochem**, v. 54, p. 237–71, 1985.

IM, S. et al. De novo assembly of transcriptome from the gametophyte of the marine red algae *Pyropia seriata* and identification of abiotic stress response genes. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1343–1353, 23 set. 2014.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 47, p. 377–403, 1996.

ISRAEL, A.; MARITNEZ-GOSS, M.; FRIEDLANDER, M. Effect of salinity and pH on growth and agar yield of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* in laboratory and outdoor cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, n. 6, p. 543–549, 1999.

JI, Y.; TANAKA, J. Effect of desiccation on the photosynthesis of seaweeds from the intertidal zone in Honshu, Japan. **Phycological Research**, v. 50, n. 2, p. 145–153, jun. 2002.

JIANG, Q. et al. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses in *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92262, jan. 2014.

JIANG, S. S. et al. Wheat drought-responsive grain proteome analysis by linear and nonlinear 2-DE and MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 16065–16083, 2012.

KAIN, J. M. Seasonal growth and photoinhibition in *Plocamium cartilagineum* (Rhodophyta) off the Isle of Man. **Phycologia**, v. 26, n. 1, p. 88–99, 1 mar. 1987.

KIM, H. Y.; COTE, G. G.; CRAIN, R. C. Potassium Channels in *Samanea saman* Protoplasts Controlled by Phytochrome and the Biological Clock. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 960–962, 14 maio 1993.

KIYOSAWA, K.; TANAKA, H. Change in potassium distribution in a *Phaseolus pulvinus* during circadian movement of the leaf. **Plant and Cell Physiology**, v. 17, n. 2, 1 abr. 1976.

KONG, F. et al. Selection of reference genes for gene expression normalization in *Pyropia yezoensis* using quantitative real-time PCR. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 1003–1010, 11 jun. 2014.

KOUKKARI, W. L.; SOTHERN, R. B. **Introducing Biological Rhythms: A Primer on the Temporal Organization of Life, with Implications for Health, Society, Reproduction, and the Natural Environment.** [s.l.] Springer Science & Business Media, 2007.

KOWALCZYK, N. et al. RT-qPCR Normalization Genes in the Red Alga *Chondrus crispus*. **PloS one**, v. 9, p. e86574, 2014.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.

KUMAR, M. et al. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 391, n. 1–2, p. 27–34, ago. 2010.

KUMAR, M. et al. Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta). **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 194–201, set. 2011a.

KUMAR, M. et al. Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta). **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 194–201, set. 2011b.

LE BAIL, A. et al. Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*. **BMC molecular biology**, v. 9, n. 1, p. 75, jan. 2008.

LIU, H. L. et al. Photosynthetic activity of *Gloiopeltis furcata* (intertidal red macroalga) in response to desiccation. **Chinese Journal of Applied Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1491–1498, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C. et al. Identification of proteins involved in desiccation tolerance in the red seaweed *Pyropia orbicularis* (Rhodophyta, Bangiales). **Proteomics**, v. 15, n. 23–24, p. 3954–3968, 7 jul. 2015.

LÜNING, K. Day and night kinetics of growth rate in green, brown and red seaweeds. **Journal of Phycology**, v. 28, n. 6, p. 794–803, 1 dez. 1992.

LÜNING, K. Circadian growth rhythm in juvenile sporophytes of Laminariales (Phaeophyta). **Journal of Phycology**, v. 30, n. 2, p. 193–199, abr. 1994.

LÜNING, K. Circadian growth in *Porphyra umbilicalis* (Rhodophyta): spectral sensitivity of the circadian system. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 1, p. 52–58, 6 fev. 2001.

LÜNING, K.; TITLYANOV, E.; TITLYANOVA, T. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. III. The red alga *Porphyra umbilicalis*. **European Journal**

of **Phycology**, v. 32, n. 2, p. 167–173, 3 maio 1997.

MA, X. B.; YANG, J. An optimized preparation method to obtain high-quality RNA from dry sunflower seeds. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 1, p. 160–8, jan. 2011.

MACKAY, R. M.; GALLANT, J. W. Beta-tubulins are encoded by at least four genes in the brown alga *Ectocarpus variabilis*. **Plant molecular biology**, v. 17, p. 487–492, 1991.

MAKAROV, V. N.; SCHOSCHINA, E. V.; LÜNING, K. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. I. Juvenile sporophytes of Laminariales (Phaeophyta). **European Journal of Phycology**, v. 30, n. 4, p. 261–266, 17 nov. 1995.

MCLACHLAN, J.; BIRD, C. J. *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. **Aquatic Botany**, v. 26, p. 27–49, 1986.

MENDES, L. F. et al. Influence of temperature, light and nutrients on the growth rates of the macroalga *Gracilaria domingensis* in synthetic seawater using experimental design. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1419–1426, 8 fev. 2012.

MENDES, L. F. et al. Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 6, p. 1939–1947, 2013.

MENDES, L. F. et al. Toxic effect of metal cation binary mixtures to the seaweed *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 13, p. 8216–8223, 2014.

MOLINA, C. et al. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. **BMC genomics**, v. 9, 2008.

MOSHELION, M. et al. Diurnal and circadian regulation of putative potassium channels in a leaf moving organ. **Plant physiology**, v. 128, n. 2, p. 634–42, fev. 2002.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant physiology**, v. 164, n. 4, p. 1636–48, 7 abr. 2014.

NOORDALLY, Z. B. et al. Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6125, p. 1316–9, 15 mar. 2013.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 85–100, 2000.

OOHUSA, T. Diurnal Rhythm in the Rates of Cell Division, Growth and Photosynthesis of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyceae) Cultured in the Laboratory. **Botanica Marina**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 1980.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

- QIAN, F. et al. The littoral red alga *Pyropia haitanensis* uses rapid accumulation of floridoside as the desiccation acclimation strategy. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 1, p. 621–632, 4 jun. 2014.
- ROSIC, N. N. et al. Validation of housekeeping genes for gene expression studies in *Symbiodinium* exposed to thermal and light stress. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 355–365, 2011.
- SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D.; JAHNKE, L. S. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützting (Rhodophyta, Bangiales). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 361, n. 2, p. 83–91, jul. 2008.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jun. 2012.
- SCHUBERT, H. et al. Circadian rhythm of photosynthesis in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): independence of the cell cycle and possible photosynthetic clock targets. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 4, p. 423–430, nov. 2004.
- SHAFER, D. J.; SHERMAN, T. D.; WYLLIE-ECHEVERRIA, S. Do desiccation tolerances control the vertical distribution of intertidal seagrasses? **Aquatic Botany**, v. 87, p. 161–166, 2007.
- SOLHEIM, B. G. B.; JOHNSON, A.; IVERSEN, T.-H. Ultradian rhythms in *Arabidopsis thaliana* leaves in microgravity. **The New phytologist**, v. 183, n. 4, p. 1043–52, jan. 2009.
- SUGIHARA, K. et al. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. **Plant Cell Physiol**, v. 41, n. 11, p. 1279–1285, 2000.
- TENHAKEN, R. Cell wall remodeling under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 771, 7 jan. 2015.
- TEO, S.-S. et al. Analyses of expressed sequence tags from an agarophyte, *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). **European Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 41–46, fev. 2007.
- TEO, S.-S. et al. Transcriptomic analysis of *Gracilaria changii* (Rhodophyta) in response to hyper- and hypoosmotic stresses. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 5, p. 1093–1099, out. 2009.
- TERADA, R.; INOUE, S.; NISHIHARA, G. N. The effect of light and temperature on the growth and photosynthesis of *Gracilariopsis chorda* (Gracilariales, Rhodophyta) from geographically separated locations of Japan. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 6, p. 1863–1872, 17 abr. 2013.

- TIAN, C. et al. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2 jan. 2015.
- TITLYANOV, E. A.; TITLYANOVA, T. V.; LÜNING, K. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. II. The green alga *Ulva pseudocurvata*. **European Journal of Phycology**, v. 31, n. 2, p. 181–188, 18 maio 1996.
- TOMANEK, L.; HELMUTH, B. Physiological ecology of rocky intertidal organisms: a synergy of concepts. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 4, p. 771–5, 2002.
- TONON, A. P. **Adaptação celular e molecular de *Gracilaria tenuistipitata* exposta à cádmio e cobre**. [s.l.] University of São Paulo - Institute of Chemistry, 2009.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, 2012.
- URSI, S.; GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M. Deleterious effect of TRIS buffer on growth rates and pigment content of *Gracilaria birdiae* Platino & EC Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta). **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 3, p. 891–896, 2008.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1–11, 18 jun. 2002.
- VANDESOMPELE, J. et al. ID2 expression in neuroblastoma does not correlate to MYCN levels and lacks prognostic value. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 456–60, 23 jan. 2003.
- WANG, C. et al. Growth and nitrogen uptake characteristics reveal outbreak mechanism of the opportunistic macroalga *Gracilaria tenuistipitata*. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e108980, jan. 2014.
- WANG, N. et al. Comparative proteomic analysis of drought tolerance in the two contrasting Tibetan wild genotypes and cultivated genotype. **BMC Genomics**, v. 16, n. 432, p. 432, 2015.
- WU, Q. L. et al. Genetic diversity of eukaryotic plankton assemblages in Eastern Tibetan Lakes differing by their salinity and altitude. **Microbial ecology**, v. 58, n. 3, p. 569–81, out. 2009.
- WU, X. et al. Selection of internal control gene for expression studies in *Porphyra haitensis* (Rhodophyta) at different life-history stages. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 4, p. 1040–1044, 31 ago. 2012.
- WU, X. et al. Variation of expression levels of seven housekeeping genes at different life-history stages in *Porphyra yezoensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–8, 2013.
- XIA, J. R. et al. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. **Bulletin of environmental contamination and**

toxicology, v. 73, n. 6, p. 979–86, dez. 2004.

XIE, C. et al. Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers. **BMC genomics**, v. 14, p. 107, jan. 2013.

YOKOYA, N. S. **Controle do crescimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodófitas: Gracilariopsis tenuifrons, Grateloupia dichotoma e Solieria filiformis.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 1996.

YU, C.-H.; LIM, P.-E.; PHANG, S.-M. Effects of irradiance and salinity on the growth of carpospore-derived tetrasporophytes of *Gracilaria edulis* and *Gracilaria tenuistipitata* var *liui* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 787–794, 20 jun. 2013.

ZADRAŽNIK, T. et al. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 254–272, 2013.

ZHANG, J.-Y. et al. Global reprogramming of transcription and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 11, p. 2553–76, nov. 2014.

ZHOU, P. et al. Characterization of gene expression associated with drought avoidance and tolerance traits in a perennial grass species. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103611, jan. 2014.

ZHOU, Z. et al. Suppression of WC-independent frequency transcription by RCO-1 is essential for *Neurospora* circadian clock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1315133110-, 25 nov. 2013.

ZOU, D.; GAO, K. Effects of desiccation and CO₂ concentrations on emerged photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 4, p. 587–592, 22 jul. 2011.

12. CAPÍTULO 2 – Interação de fatores abióticos e relógio biológico no crescimento de *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae)

13. INTRODUÇÃO

O aumento drástico de crescimento fitoplanctônico na transição do inverno para primavera é conhecido como eflorescência algal (algal bloom). As eflorescências sazonais podem levar à perda de milhões de dólares se espécies tóxicas estiverem envolvidas (LANDSBERG, 2002). Por exemplo, desde 1997 no Brasil marés vermelhas matam toneladas de peixes e causam severas intoxicações, como o paralytic shellfish poisoning, impedindo a venda de milhares de toneladas de ostras e similares (CERON, 2016a, 2016b, 2017).

Inicialmente, pensou-se que as eflorescências fitoplanctônicas ocorriam quando o aumento da temperatura na primavera causava estratificação das camadas da coluna de água, confinando os nutrientes na camada fótica, condição ideal para crescimento súbito de espécies fitoplanctônicas (SVERDRUP, 1953). Entretanto, diversas evidências sugerem que a regulação do início das eflorescências de primavera é muito similar em ecossistemas altamente produtivos e oligotróficos, o que rejeita em parte a hipótese inicialmente proposta (BEHRENFELD, 2010; CHISWELL, 2011; WINDER; CLOERN, 2010). Recentemente, foi proposto que o início da eflorescência é uma resposta a uma combinação de fatores físicos e químicos, como luz, temperatura, nutrientes, comprimento do dia, e fatores ecológicos como interação com bactérias e herbivoria. Além disso, essa interação de parâmetros é única para cada espécie de fitoplancton, o que gera uma sucessão de eflorescências ao longo do ano (BEHRENFELD, 2010; BLAUW et al., 2012; FIELD et al., 1998; HUISMAN et al., 1999; MAHADEVAN et al., 2012; SOMMER; LENGFELLNER, 2008; TAYLOR; FERRARI, 2011; TOWNSEND et al., 1992; WINDER et al., 2010, 2012). A intensa variação espaço-temporal e taxonômica

das eflorescências torna o cenário ainda mais complexo, o que exige a adoção de cada vez mais metodologias diferentes para a caracterização mais detalhada dos fatores que desencadeiam o crescimento do fitoplancton.

Uma metodologia chamada metabarcoding foi recentemente desenvolvida que permite o detalhamento da diversidade das comunidades fitoplanctônicas. Após total extração de DNA de uma amostra ambiental e seguinte sequenciamento em larga escala de genes barcoding específicos, a estrutura de comunidade altamente detalhada pode ser acessada, caracterizada a partir da diversidade de OTUs (operational taxonomic unit). Este método já foi usado para analisar a diversidade de diatomáceas e dinoflagelados no oceano global (LE BESCOT et al., 2016; MALVIYA et al., 2016), a diversidade de ambientes bentônicos de um estuário contaminado por mercúrio, (CHARITON et al., 2015) e também para explorar a frequência e importância da simbiose em algumas espécies de fitoplâncton (CABELLO et al., 2016). Recentemente, tem sido usada para verificar a dinâmica anual da sucessão de comunidades fitoplanctônicas na costa do golfo de Lyon, no mediterrâneo (LAMBERT; BOUGET, 2017).

Diversas observações mostraram que eflorescências de primavera estão mais relacionadas a mudanças no fotoperíodo do que aumentos na temperatura (BEC et al., 2005; O'KELLY et al., 2003; VAQUER et al., 1996). O relógio biológico é o principal mecanismo relacionado à percepção da duração do dia e da noite. Esta via de sinalização modula a sincronização de processos vitais aos ciclos diários de luz e temperatura através regulação da transcrição e da tradução. Assim, o relógio biológico permite o ajuste diário de diversos processos moleculares e fisiológicos, possibilitando, por exemplo a antecipação de estações do ano (ASCHOFF, 1984; DUNLAP, 1999;

NONGKYNRIH; SHARMA, 1992; PITTENDRIGH; KYNER; TAKAMURA, 1991). A importância dessa via na fisiologia e desenvolvimento é comprovada pela identificação e caracterização dos genes do relógio circadiano em mais de 15 espécies de eucariotos fotossintetizantes do grupo Archaeplastida (SONG et al., 2010).

Algas verdes (Archaeplastida:Chlorophyta) são de grande importância na cadeia trófica e em ciclos biogeoquímicos em ecossistemas aquáticos. Avanços biotecnológicos na manipulação e cultivo destes organismos estão sendo feitos para a produção de biocombustíveis e um grande espectro de moléculas bioativas para as indústrias farmacêutica e cosmética (LEE et al., 2010; PULZ; GROSS, 2004; SIMAS-RODRIGUES et al., 2015; WICHUK et al., 2014; WIJFFELS; BARBOSA, 2010).

Em regiões oligotróficas, que são a maior parte dos oceanos, o picofitoplâncton (células menores que 2 μm) compõe a maior parte do fitoplâncton. É estimado que 70% da produtividade primária dos oceanos dependa dos picofitoplâncton, principalmente cianobactérias e clorófitas, o que exalta a importância de grupo (CAROPPO, 2000; JOHNSON; SIEBURTH, 1982).

O piceucarioto *Ostreococcus tauri* é o menor eucarioto de vida livre já descrito, apresentando mínima complexidade celular e molecular, além de grande facilidade de cultivo e manipulação gênica (BLANC-MATHIEU et al., 2014; CHRÉTIENNOT-DINET et al., 1995; COURTIES et al., 1994; VAN OOIJEN et al., 2012). *O. tauri* possui pouca redundância dos genes do relógio biológico e redes simplificadas de regulação molecular (CORELLOU et al., 2009; THOMMEN et al., 2015). TOC1 e CCA1 estão conservados, mas outros genes do relógio de plantas terrestres como GIGANTEA e ELF3 estão ausentes em seu reduzido genoma de 12mb (BLANC-MATHIEU et al., 2014; DERELLE et al., 2006; PALENIK et al., 2007). Além disso, muitas características de

relógio de plantas estão presentes, como a expressão de CAB (CHLOROPHYLL A/B BINDING) sob luz constante, as fases de expressão de CCA1 e TOC1 e os motivos de promotores do gene TOC1 (CORELLOU et al., 2009; MORANT et al., 2010a).

Os fotorreceptores de *O. tauri* já foram funcionalmente caracterizados, como CRY, LOV-HK (LIGHT, OXYGEN, OR VOLTAGE SENSING - CONTAINING HISTIDINE KINASE) e Rhod-HK (RHODOPSIN HISTIDINE KINASE), os quais podem estar envolvidos nos mecanismos que desencadeiam as eflorescências sazonais. O gene LOVHK foi descrito como um dos genes principais do relógio já que este pode atuar tanto como regulador da transcrição de CCA1 como um receptor de luz azul e vermelha (DJOUANI-TAHRI et al., 2011; HEIJDE et al., 2010).

Estudos sobre a influência de variáveis abióticas na dinâmica das populações de picofitoplancton já foram feitos na laguna de onde *O. tauri* foi isolada (BEC et al., 2005) e tem sido amplamente detalhados em mar aberto (LAMBERT; BOUGET, 2017), através de metabarcoding, revelando que podem existir diferenças significativas entre as linhagens lacustres e pelágicas na ritmicidade das eflorescências, além de múltiplas interações bióticas e abióticas.

Este capítulo propõe a hipótese de que as eflorescências sazonais de *O. tauri* estão relacionadas com a expressão diferencial de genes relógio biológico ao longo do inverno e que a antecipação das condições ótimas de crescimento culmina em um maior número de células em anos quentes, o que pode explicar as variações de fase das eflorescências em diferentes anos.

14. HIPÓTESE

Genes do relógio biológico central mudam o controle do crescimento de *Ostreococcus tauri* sob diferentes condições indutoras de eflorescências.

14.1. Objetivos

14.1.1. Testar como a deleção/supereexpressão do gene TOC1 modifica o crescimento de *O.tauri* sob diferentes condições simuladas de temperatura, luz e salinidade

14.1.2. Testar como a deleção do gene LOV-HK modifica o crescimento de *O.tauri* sob diferentes condições simuladas de temperatura, luz e salinidade

15. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta parte do estudo foi inteiramente desenvolvida no Laboratório de Oceanografia Microbiana (LOMIC) do Observatório Oceanológico de Banyuls-sur-mer (Laboratoire Arago) da Universidade Pierre et Marie Curie (UPMC – Paris VI) durante um estágio de pesquisa no exterior (BEPE – FAPESP).

15.1. Cultivo e linhagens

O cultivo das linhagens de *Ostreococcus tauri* Courties & Chrétiennot-Dinet (CHRÉTIENNOT-DINET et al., 1995; COURTIES et al., 1994) foi feito em água do mar artificial (artificial seawater - ASW) enriquecido pelo meio Keller (KELLER et al., 1987). As células foram mantidas em frascos de 50 ml (Sarsted) sob luz azul constante de 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PPF. Para medidas de crescimento, as células foram repicadas em microplacas transparentes de 96 poços de 2 ml (deep-well plates) em uma concentração final de 10^6 cell·ml⁻¹ em 1,5 ml. As células foram aclimatadas por 7 dias sob condições de luz e temperatura específicas para cada experimento. Após a aclimação, os cultivos foram repicados novamente sob as mesmas condições e células foram amostradas para citometria de fluxo durante 10 dias.

Duas linhagens de *O. tauri* foram obtidas da coleção Roscoff Culture Collection: OTTH595 (RCC745), que será referida como WT (wild type), e OBAN (RCC1108). Como WT foi isolada há mais de 20 anos de uma laguna, também foram comparadas as respostas de uma linhagem pelágica, a OBAN, que foi exposta a menor variação de salinidade e temperatura. OBAN foi isolada em 2006 da boia oceanográfica SOLA (SOMLIT Observatory Laboratoire Arago – Banyuls, France) no Golfo de Lyon, região costeira do mar mediterrâneo (GRIMSLEY et al., 2010) . Para identificar respostas

específicas para cada gene, mutantes da linhagem OTTH595 foram usados para os genes TOC1 e LOV-HK, um superexpresso e um *knocked-down* para TOC1 (TOC1-ox e TOC1-ko) e um *knocked-down* para o gene LOV-HK (LOVko). Estes mutantes foram feitos sob controle do promotor forte e constitutivo HAPT (HIGH AFFINITY PHOSPHATE TRANSPORTER) e a transformação e seleção das linhagens foi feita previamente (CORELLOU et al., 2009; DJOUANI-TAHRI et al., 2011; VAN OOIJEN et al., 2012).

As amostras injetadas no citômetro de fluxo (BD Accury C6) foram diluídas 10x em solução de fixação com 0,25% de glutaraldeído e 0,01% de ácido plurônico em ASW. Todas as placas foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente e depois congeladas a – 20°C e armazenadas para posterior análise. Micro-esferas (microbeads - BD Trucount) foram usadas para normalizar o fluxo.

15.2 Análises e estatística

Para a análise da citometria, o programa BD Csample foi usado. Para construção de gráficos, cálculos de taxa de crescimento e estatística, os programas Microsoft Excel 2017 e RStudio com os pacotes grofit (KAHM et al., 2010) e ggplot2 (WICKHAM, 2006) foram usados. As análises de variância e comparações par-a-par dos testes foram feitas por testes de Tukey-HSD (Honest significant difference). Para a determinar quais fatores influenciaram mais no crescimento, fez-se uma correlação linear entre as taxas de crescimento e os valores de temperatura, luz e salinidade. A taxa de crescimento foi determinada pela inclinação da regressão linear da contagem celular durante a fase exponencial.

15.3 Condições indutoras de eflorescência

As condições de cultivo foram determinadas baseado numa série de tempo de 7 anos registrada em SOLA, onde a temperatura, salinidade, nitrato, aporte fluvial e clorofila foram medidos. A riqueza de espécies também foi determinada pela metodologia de metabarcoding (dados ainda não publicados - (LAMBERT; BOUGET, 2017)). A intensidade e duração da iluminação também foram registradas e simuladas em incubadoras com lâmpadas LED associadas a um software (SunInsollation® - exclusivamente desenvolvido para este estudo) para controle de intensidade e fotoperíodo. Assim, um ambiente com condições precisamente simuladas estava disponível para testar as hipóteses de eflorescência. As condições testadas foram obtidas a partir da identificação dos ritmos anuais de eflorescência, que tinham início no começo do inverno, durando até o fim da primavera (meses de dezembro a abril – Figura 2.1; Tabela A.2).

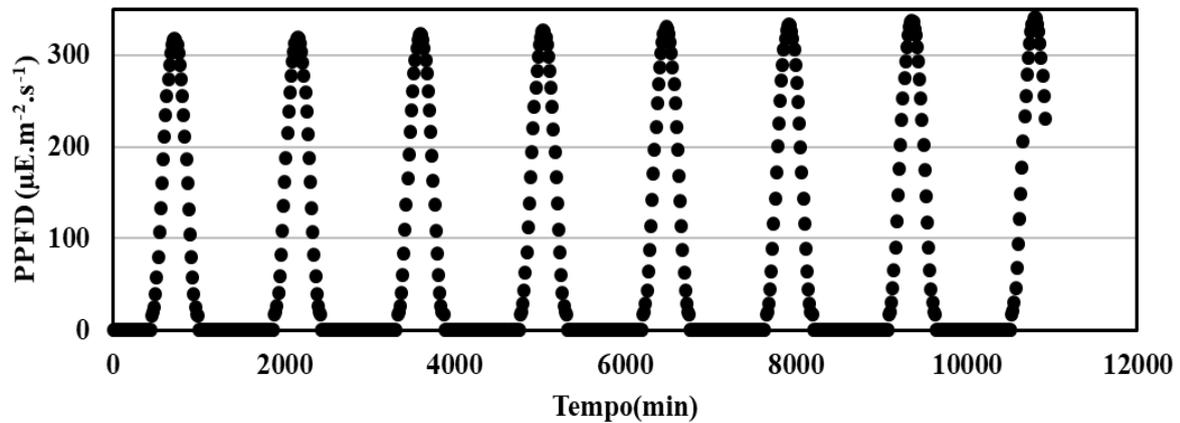


Figura 2.1. Simulação dos ciclos de claro e escuro do período entre os dias 10 e 17 do mês de janeiro de 2016 dentro de uma incubadora com PPFD (photosynthetic photon flux density) máximo de $318 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Percebe-se um leve aumento do máximo PPFD, correspondente a 8% de diferença entre o último e o primeiro dia, derivado do aumento real medido. A duração média do dia foi de 9,5 horas e a integral de luz diária (daily light integral - DLI) média foi de $593 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$.

Tabela A.2. Condições de luz e temperatura usadas em cada incubadora para simular cada mês onde eflorescência de *O. tauri* foi identificada. Temperatura em $^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo em horas, PPFD em $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e DLI em $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$.

	2012 (Frio)	2013 (Ameno)	2014 (Quente)	PPFD ^a	Fotoperíodo	DLI
DEC	13	12,7	16	299	9,14	530
JAN	12	12,7	12	318	9,5	593
FEB	10	11,1	12,5	461	10,34	770
MAR	11	11,2	13	640	11,92	1554
APR	12	13,1	14	799	13,35	2495

a – Valor máximo ao meio dia

16. RESULTADOS

Em geral as curvas de crescimento apresentaram suas fases exponenciais dentro de 10 dias (Figuras 2.3, 2.5 e 2.8). As taxas de crescimento da linhagem selvagem (WT) se correlacionaram linearmente com a temperatura e luz (Tabela B.2, $R^2 = 0,315$, Figura 2.2). Já na linhagem com a superexpressão do gene TOC1 (TOC1ox) e na linhagem pelágica (OBAN), o modelo linear explicou melhor a taxa de crescimento (Tabela B.2, $R^2 = 0,469$ e $0,443$, respectivamente). Nas linhagens *knock-down* o modelo de regressão linear foi semelhante à WT (Figura 2.2).

Tabela B.2. Parâmetros do modelo de regressão linear múltipla da taxa de crescimento com temperatura e luz para todas linhagens de *Ostreococcus tauri*. “coef” representa os coeficientes de cada variável. “F-valor” e “T-valor” representam a força dos testes Fisher e T-student, respectivamente. NA significa não aplicável.

Linhagem	P-valor Geral	R ²	F-valor	coef_TEMP	p-valor Temp	T-valor Temp	coef Luz	p-valor Luz	T-valor Luz
WT	1,17E-05	0,315	13,81	0,0429	7,90E-05	4,24	0,0429	0,0015	3,32
OBAN	5,65E-09	0,469	26,50	0,0496	7,30E-07	5,53	0,0496	0,0000	5,01
TOC1ox	2,40E-08	0,443	23,84	0,0700	4,70E-08	6,25	0,0700	0,0012	3,39
TOC1ko	5,60E-06	0,332	14,89	0,0440	8,28E-04	3,52	0,0440	0,0001	4,34
LOVko	8,47E-06	0,322	14,28	0,0537	9,81E-06	4,83	0,0537	0,0140	2,53

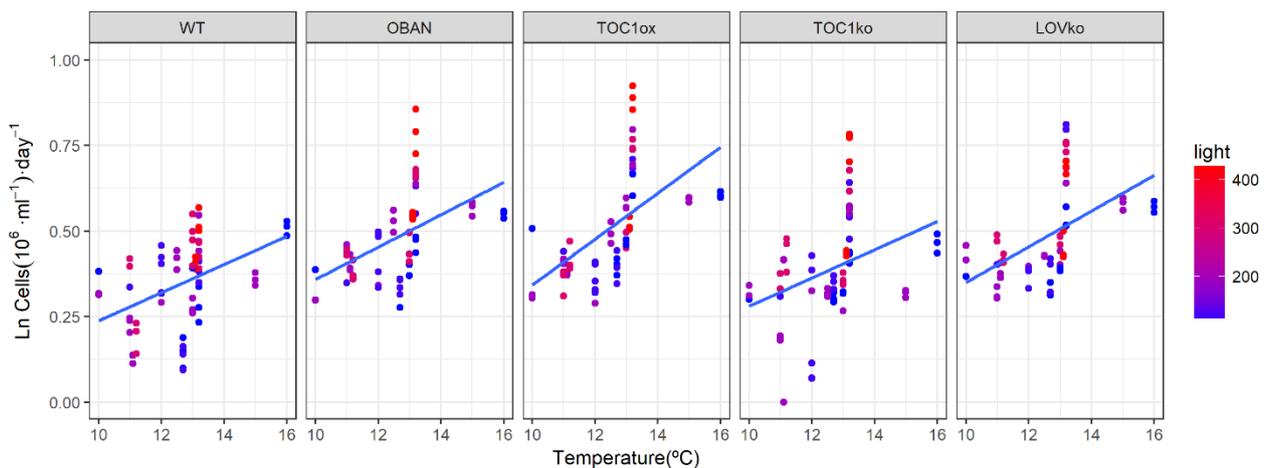


Figura 2.2. Regressão linear da taxa de crescimento e temperatura para todas linhagens testadas. A irradiância usada em cada experimento é representada pela escala de cor de azul (menos intenso) ao vermelho (mais intenso). A linha azul representa o modelo de regressão linear. Os parâmetros estatísticos de cada curva estão representados na Tabela A.2.

A análise da taxa de crescimento mostrou que a deleção do gene LOV-HK (LOVko) mostrou crescimento significativamente menor em várias condições de luz em temperaturas simuladas de um ano ameno (Tabela C.2; Figura 2.4A e B).

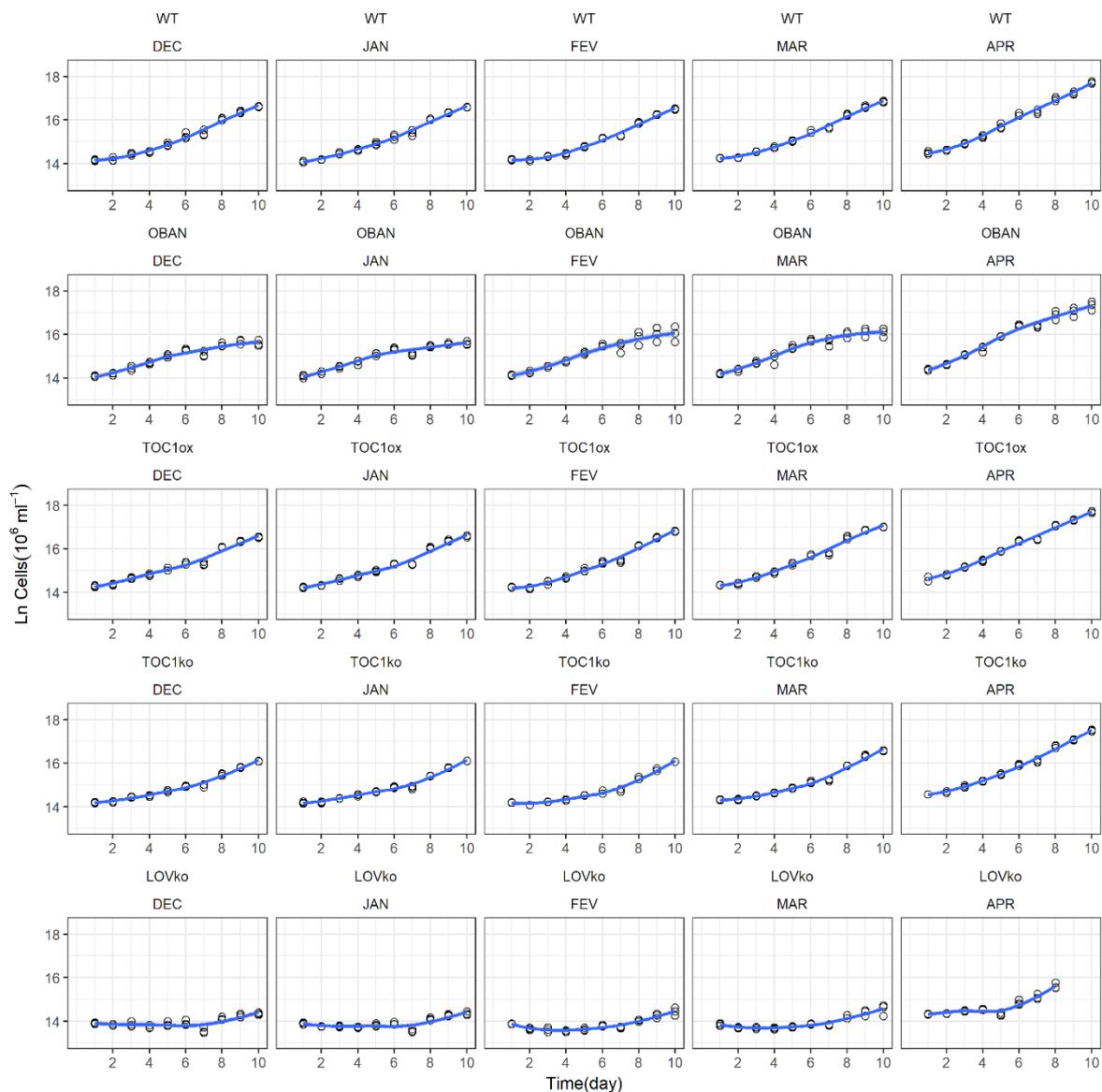


Figura 2.3. Múltiplos gráficos do crescimento de todas as linhagens testadas de *Ostreococcus tauri* durante a simulação da transição de inverno para primavera em ano de temperaturas amenas ($n = 3$). Foram utilizadas as linhagens WT, OBAN, TOC1ox, TOC1ko e LOVko.

Curiosamente, LOVko não mostrou diferenças significativas ($p = 0,01$) quando era submetida a condições do mês de fevereiro no ano quente (Figura 2.6). Isso nos motivou a testar, fixando as condições de luz, a influência da temperatura no crescimento de *O. tauri*. Desta forma, observou-se que, independentemente da temperatura, a taxa de crescimento de LOVko estava sempre significativamente baixa, o que caracteriza o resultado anterior como um falso-negativo (Figura 2.7; Tabela C.2). Além dessas diferenças, todas linhagens mostraram uma tendência de crescer mais quando eram submetidas a mais luz (Figura 2.4B e Figura 2.6B).

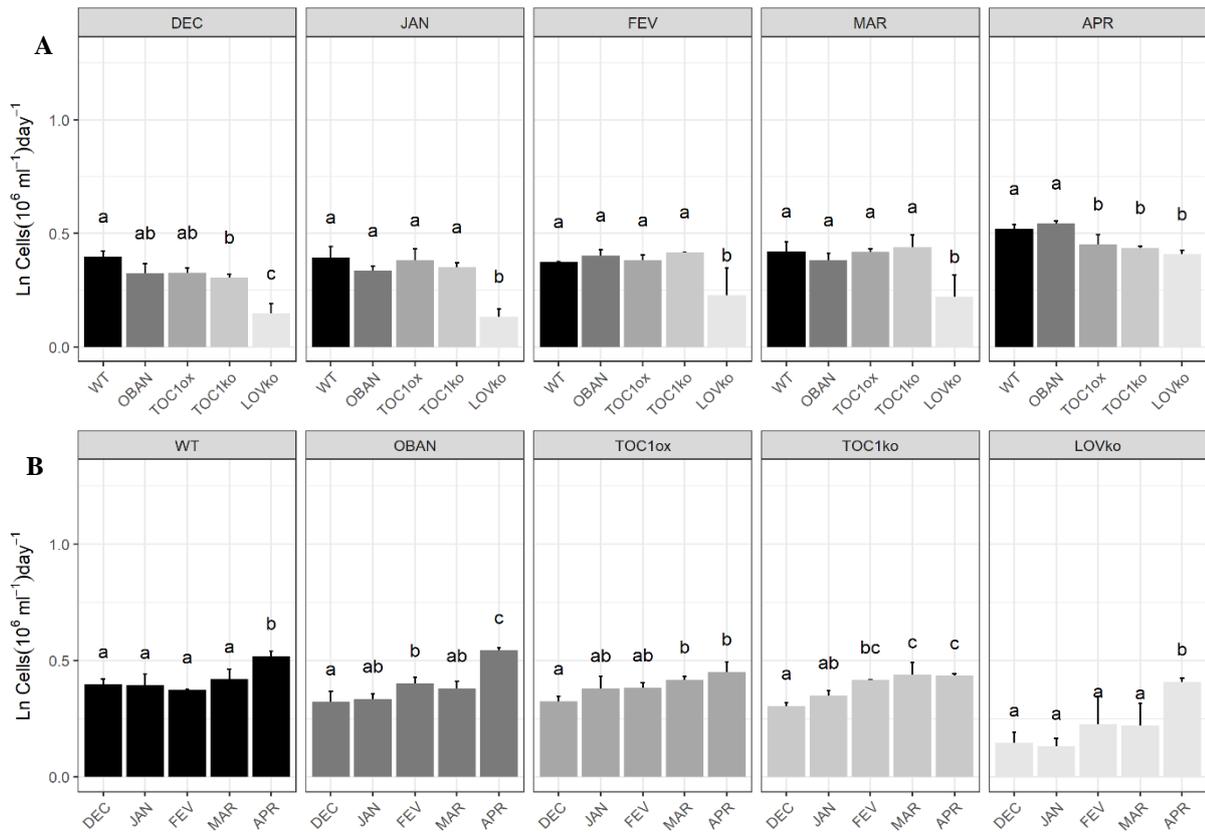


Figura 2.4. Taxa de crescimento de cada linhagem de *Ostreococcus tauri* durante a simulação da transição de inverno para primavera em ano de temperaturas amenas. A) Dados organizados por mês permitem a comparação entre linhagens. B) Mesmos dados organizados por linhagem permitem a visualização de uma leve tendência de maior crescimento quanto mais luz e temperatura incididas. Letras iguais denotam a ausência de diferença estatística pelo teste Post hoc Tukey-HSD. O p-valor de corte usado foi de 0,005.

Tabela C.2. P-valores significantes das comparações pelo teste de ranqueamento Post hoc Tukey-HSD (Honest Significant Difference) entre mutantes de *Ostreococcus tauri* e a linhagem selvagem (WT)

Experimento	Tratamento	Relação	p-valores	Experimento	Tratamento	Relação	p-valores
Ano ameno	Dezembro	WT-LOVko	0,0000173	Fevereiro	11°C	WT-LOVko	2,26E-07
	Janeiro	WT-LOVko	0,0000538			WT-TOC1ko	3,24E-08
	Fevereiro	WT-LOVko	0,000000223			WT-TOC1ox	9,53E-05
	Março	WT-LOVko	0,000263745		WT-LOVko	2,35E-07	
	Abril	WT-LOVko	0,001019		WT-OBAN	6,71E-05	
Ano quente	Dezembro	WT-LOVko	0,000645	13°C	WT-TOC1ko	5,11E-07	
		WT-TOC1ko	0,0000241		WT-TOC1ox	4,82E-05	
		WT-LOVko	0,003214	15°C	WT-LOVko	9,96E-07	
	Janeiro	WT-OBAN	0,0000586		WT-TOC1ko	2,20E-07	
	Fevereiro	WT-TOC1ko	0,000000781				
		WT-TOC1ko	0,0000396				
	Março	WT-TOC1ko	0,004071				
Ano frio	Dezembro	WT-TOC1ox	0,000282447				
		WT-LOVko	0,0098467				
Janeiro	WT-TOC1ox	0,000323546					
13,2°C	Dezembro	WT-LOVko	1,21E-06				
		WT-OBAN	0,0005939				
		WT-TOC1ko	0,0001185				
	Janeiro	WT-LOVko	0,00034917				
		WT-LOVko	0,00017774				
	Fevereiro	WT-TOC1ko	0,00349531				
		WT-LOVko	5,38E-07				
Março	WT-LOVko	8,20E-06					
Abril	WT-TOC1ox	0,001148					

A taxa de crescimento de *O. tauri* exibiu valores máximos em temperaturas de um ano considerado ameno (Figura 2.4). No entanto, quando se testou o efeito de temperaturas médias registradas para meses quentes (Figura 2.6) e frios (Figura 2.9), diversas diferenças puderam ser observadas. Em condições de ano quente, TOC1ko teve taxa de crescimento significativamente menor que a linhagem selvagem em todos os meses (Figura 17; Tabela C.2). LOVko só foi negativamente afetada nas condições do mês de dezembro em ano quente (Figura 2.6, primeiro painel) e, surpreendentemente, mostrou taxa de crescimento maior que WT em janeiro, que foi somente 0,7°C mais quente que a mesma condição de luz no ano ameno.

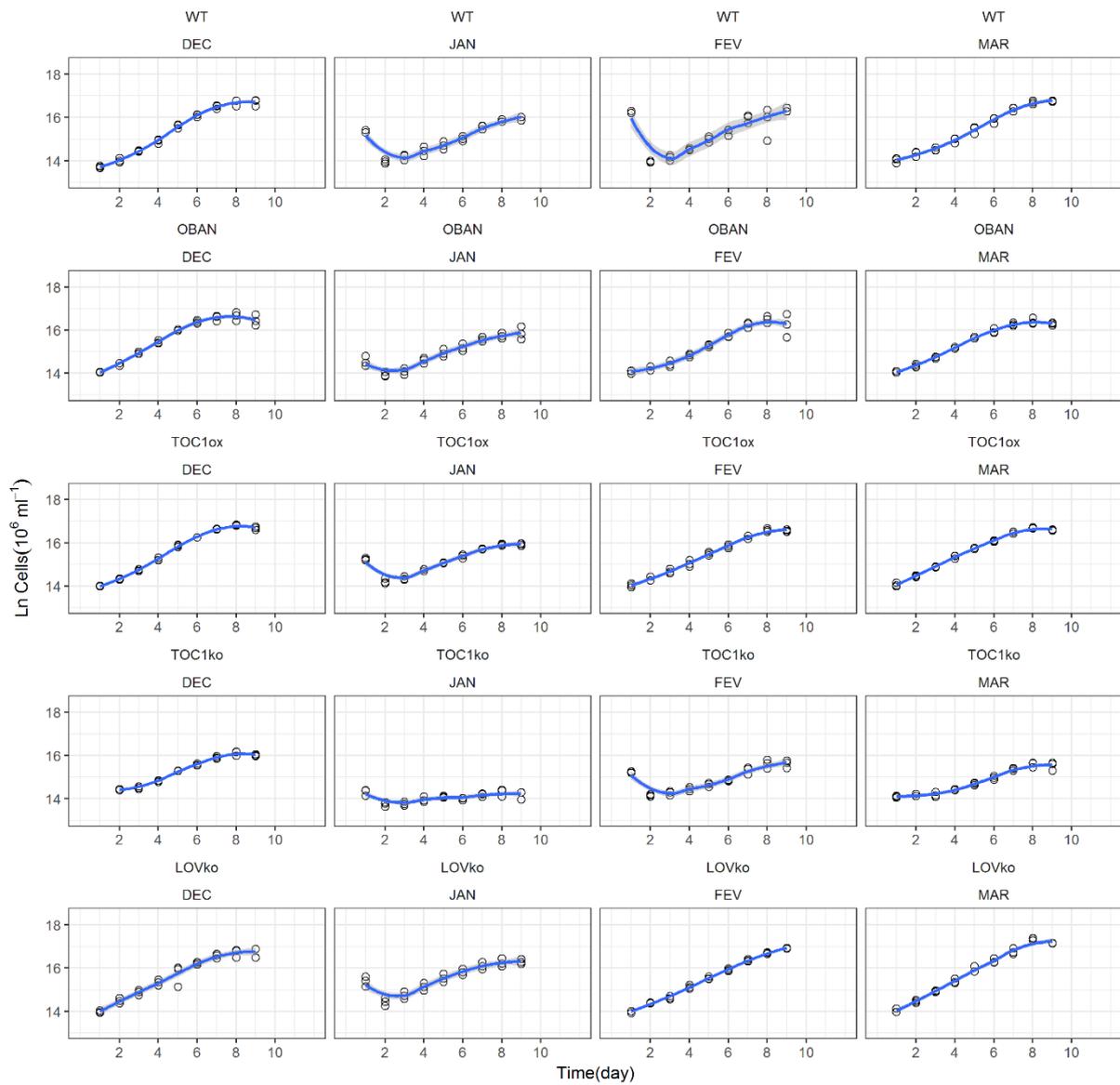


Figura 2.5. Múltiplos gráficos do crescimento de todas as linhagens testadas de *Ostreococcus tauri* durante a simulação da transição de inverno para primavera em ano de temperaturas quentes ($n = 3$).

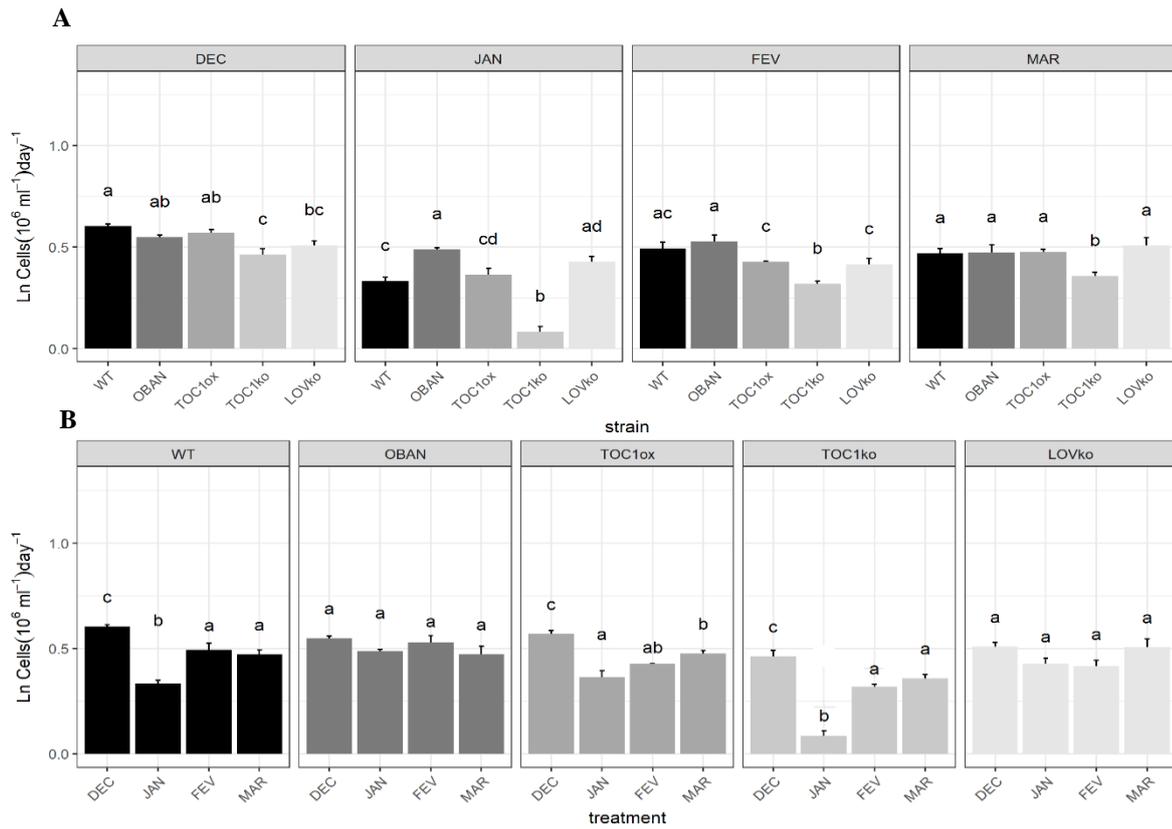


Figura 2.6. Taxa de crescimento de cada linhagem de *Ostreococcus tauri* durante a simulação da transição de inverno para primavera em ano de temperaturas quentes. A) Dados organizados por mês permitem a comparação entre linhagens. B) Mesmos dados organizados por linhagem permitem a visualização de uma leve tendência de maior crescimento quanto mais luz e temperatura incididas. Letras iguais denotam a ausência de diferença estatística pelo teste Post hoc Tukey-HSD. O p-valor de corte usado foi de 0,005.

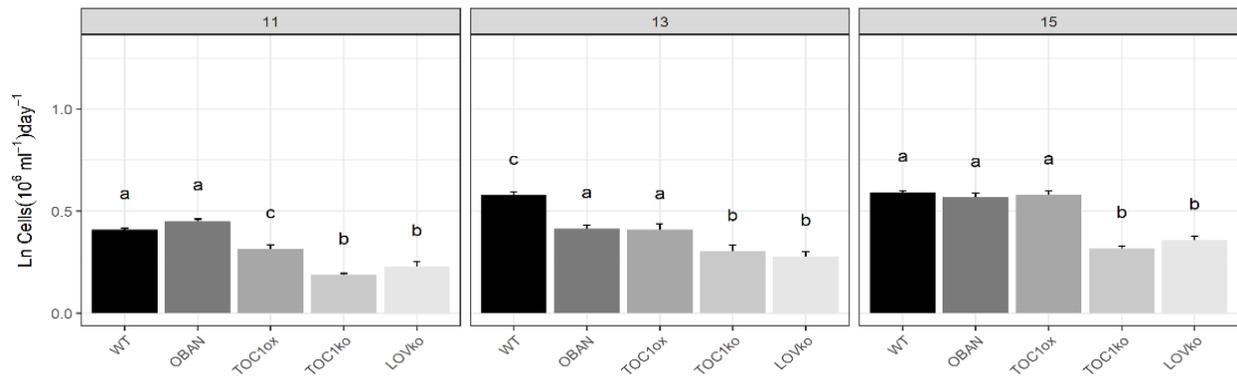


Figura 2.7. Taxa de crescimento de cada linhagem testada sob as condições de luz do mês de fevereiro e diferentes temperaturas. Os dados estão organizados por temperatura para melhor comparação entre as linhagens. O p-valor significativo usado foi de 0,005.

Simulando-se meses de um ano frio, as tendências de menores taxas de crescimento para LOVko e TOC1ko também foram vistas durante as condições do mês de dezembro (Figura 2.9A; Tabela C.2) onde houve a maior temperatura, 13°C. Isso pode estar relacionado com o fato de que a linhagem selvagem é mais afetada por temperaturas baixas que os mutantes, o que contribui para a hipótese de que o funcionamento diferencial do relógio durante dias curtos pode estar relacionado com aclimação a temperaturas baixas.

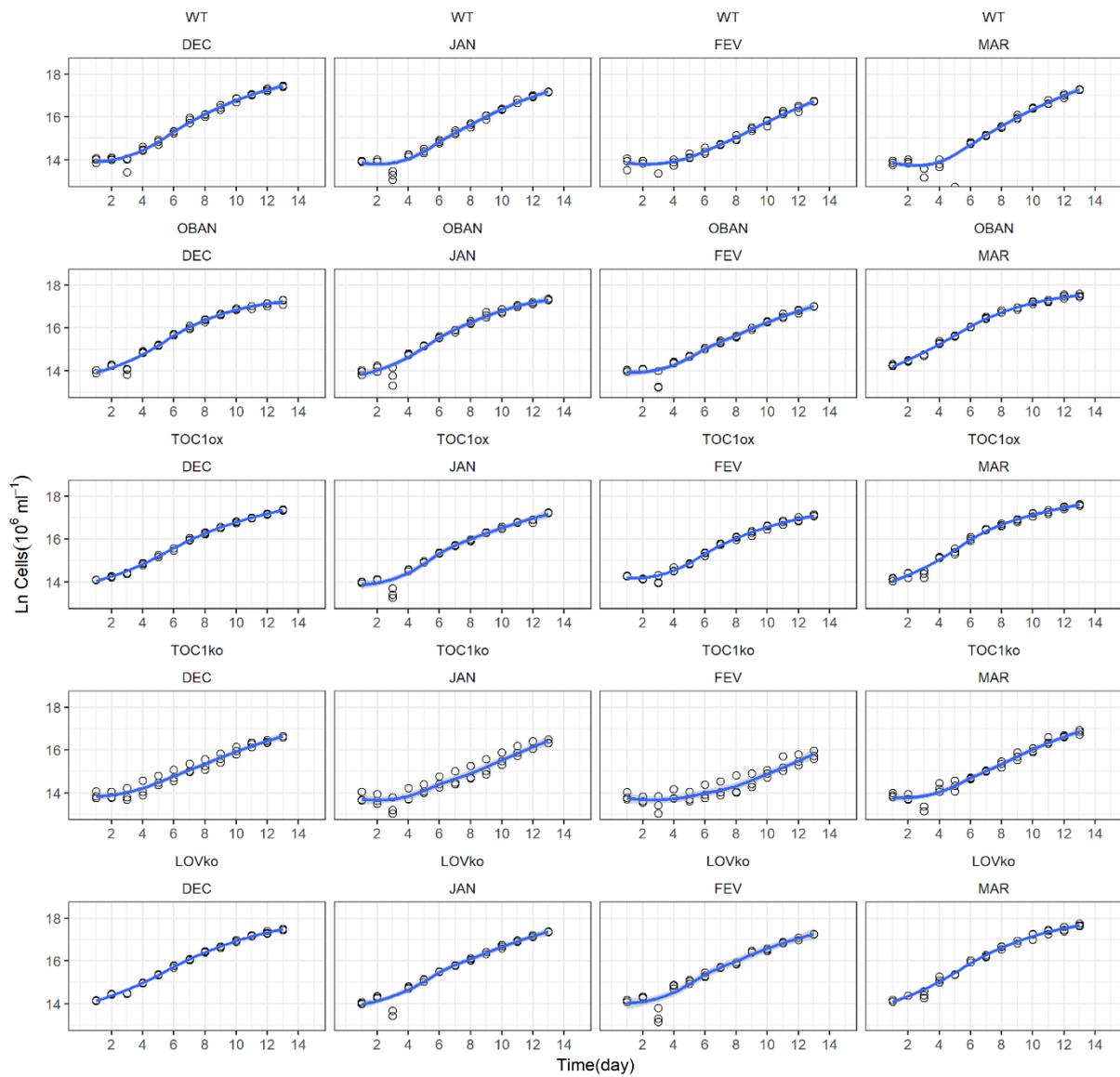


Figura 2.8. Múltiplos gráficos do crescimento de todas as linhagens testadas de *Ostreococcus tauri* durante a simulação da transição de inverno para primavera em ano de temperaturas frias ($n = 3$)

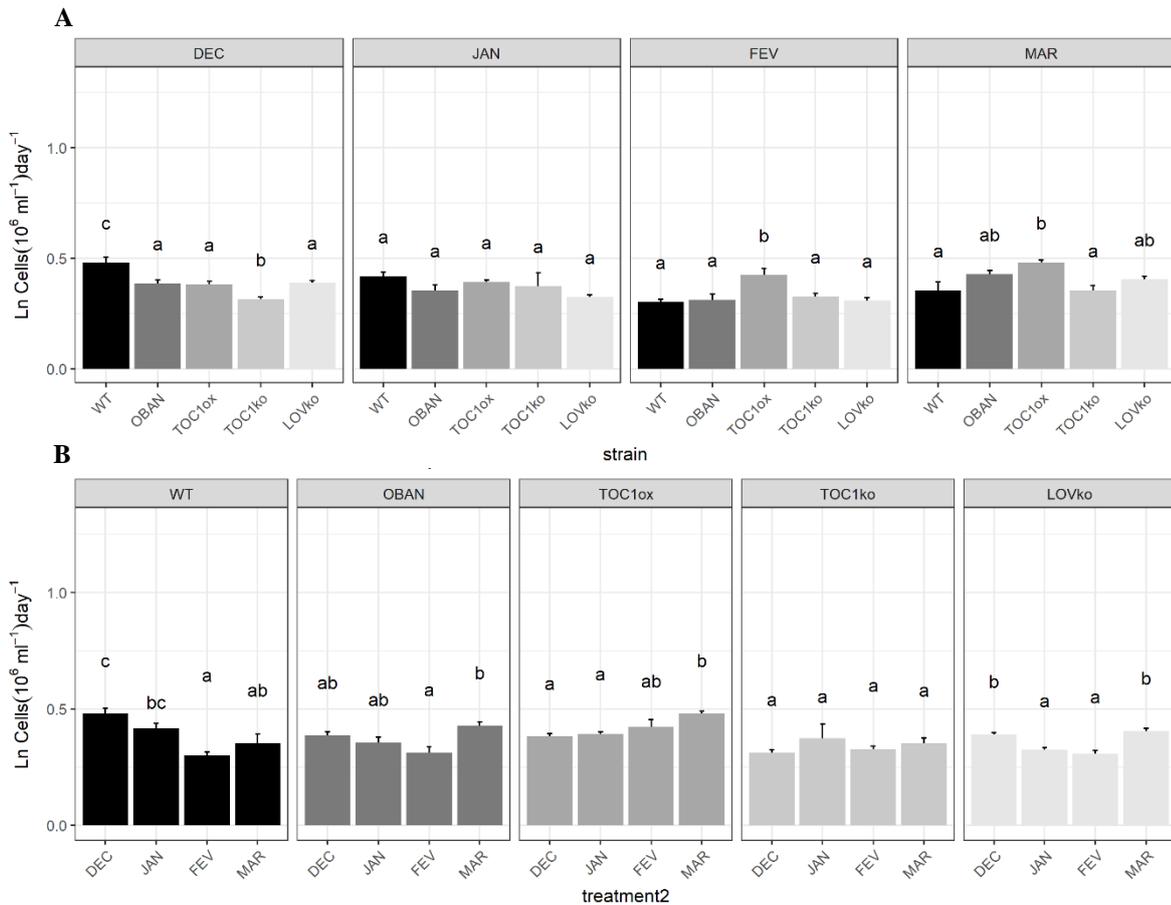


Figura 2.9. Taxa de crescimento de cada linhagem de *Ostreococcus tauri* durante a simulação da transição de inverno para primavera em ano de temperaturas baixas. Dados organizados por mês permitem a comparação entre linhagens. B) Mesmos dados organizados por linhagem permitem a visualização de uma leve tendência de maior crescimento quanto mais luz e temperatura incididas. Letras iguais denotam a ausência de diferença estatística pelo teste Post hoc Tukey-HSD. O p-valor de corte usado foi de 0,005.

A linhagem TOC1ox mostrou maiores taxa de crescimento na simulação dos meses de fevereiro e março no ano frio, os quais tinham as temperaturas mais baixas (10 e 11°C, respectivamente), porém exibiam dias longos e com maior intensidade luminosa (Tabela A.2). Entretanto, quando a temperatura foi fixada em 13,2°C (Figura 2.10), o mesmo resultado não é observado, o que sugere uma interação entre baixas temperaturas e mais longos fotoperíodos para uma maior taxa de crescimento de *Ostreococcus*.

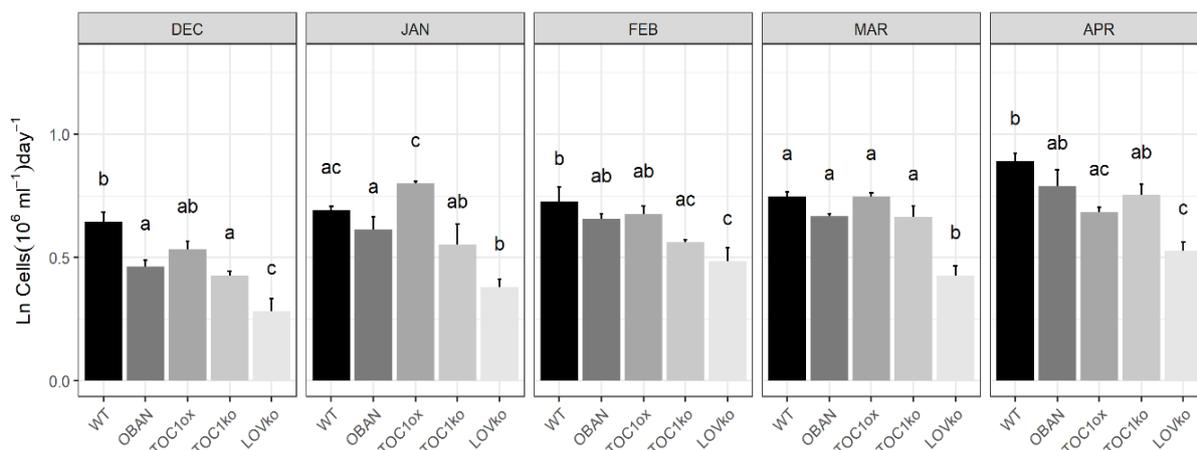


Figura 2.10. Crescimento de cada linhagem de *Ostreococcus tauri* cultivadas a 13,2°C. Dados organizados por mês permitem comparações entre linhagens. Letras iguais denotam a ausência de diferença estatística pelo teste Post hoc Tukey-HSD. O p-valor de corte usado foi de 0,005.

A variação simultânea de temperatura, luz e salinidade evidenciou que a salinidade pode ser um fator que aumenta significativamente o efeito da complexidade da interação entre a luz e temperatura sob as taxas de crescimento (Figura 2.12). Isso pode ser visualizado quando as taxas de crescimento, sob mesmas condições de luz e temperatura de um ano frio, exibem diferenças significativas entre salinidades 5 e 15, quando se compara TOC1ox e LOVko à WT (Figura 2.12 – dois primeiros painéis). Independentemente das condições de luz e temperatura, todas as linhagens cresceram menos em salinidade 5 que em 15 (Figura 2.12). A única exceção foi a linhagem TOC1ox, que não demonstrou diferença nos tratamentos de salinidade nas condições de luz e temperatura dos meses de Janeiro e Fevereiro, quando comparada com WT. Além disso, sob salinidade 15 e condições do mês de dezembro, com a temperatura mais elevada, esta linhagem demonstrou o maior crescimento de todas condições testadas (Figura 2.12, segundo painel), mostrando a importância da temperatura no crescimento, mesmo sob múltiplas variações de condições. Entretanto, mesmo sob temperaturas mais frias, a linhagem TOC1ox demonstrou crescimento

significativamente maior que WT em baixa salinidade (Figura 2.12A, 3º e 5º painéis), efeito não visto sob salinidade mais elevada (Figura 212A, 2º, 4º e 6º painéis).

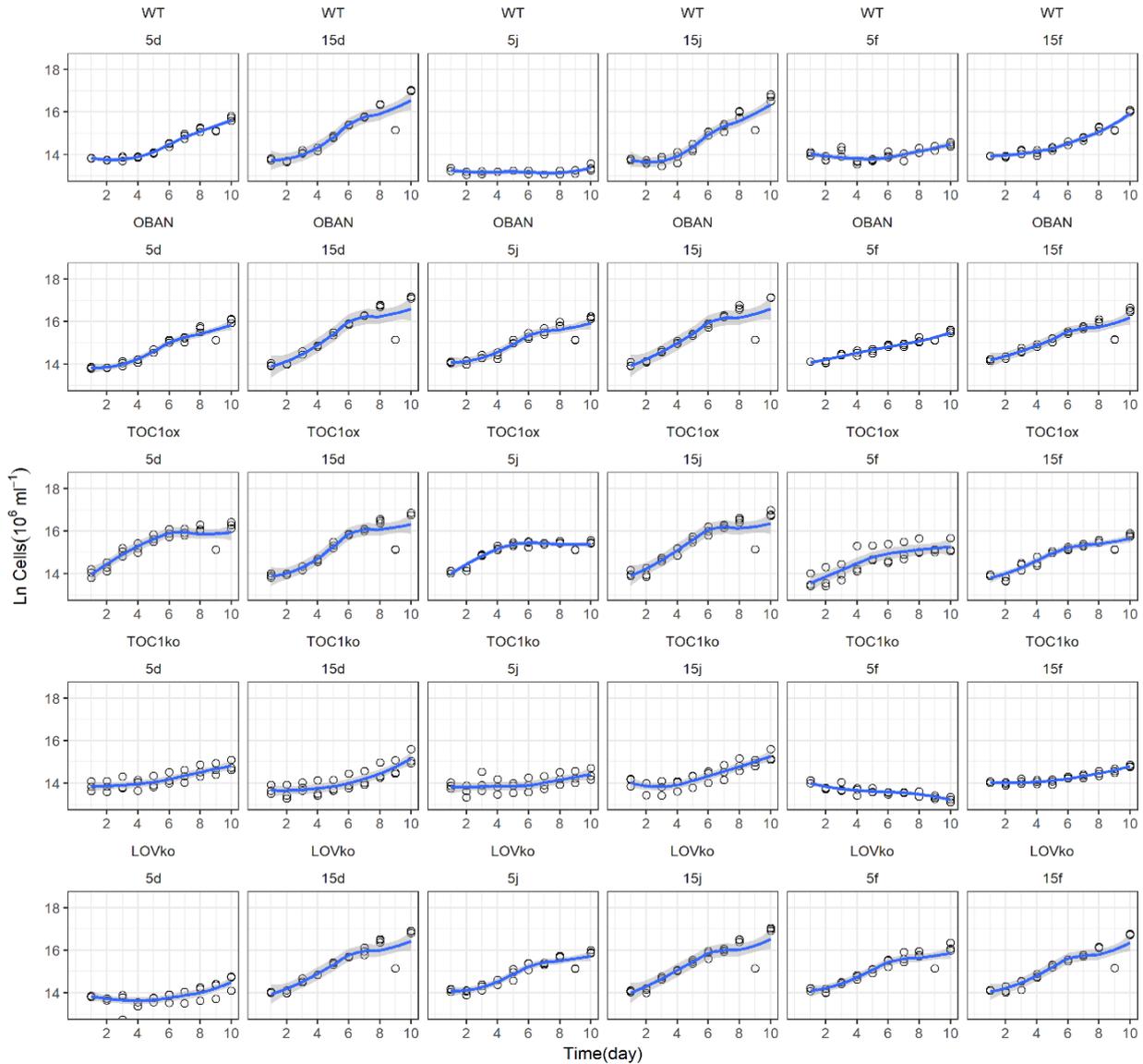


Figura 2.11. Múltiplos gráficos do crescimento de todas as linhagens testadas de *Ostreococcus tauri* durante a variação simultânea de fotoperíodo, temperatura e salinidade (n = 3). Acima de cada painel está o nome das linhagens e o teste feito: os números 5 e 15 representam salinidades testadas e as letras “d”, “j” e “f” representam as condições de luz e temperaturas dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro do ano frio, como descrito na Tabela A.2.

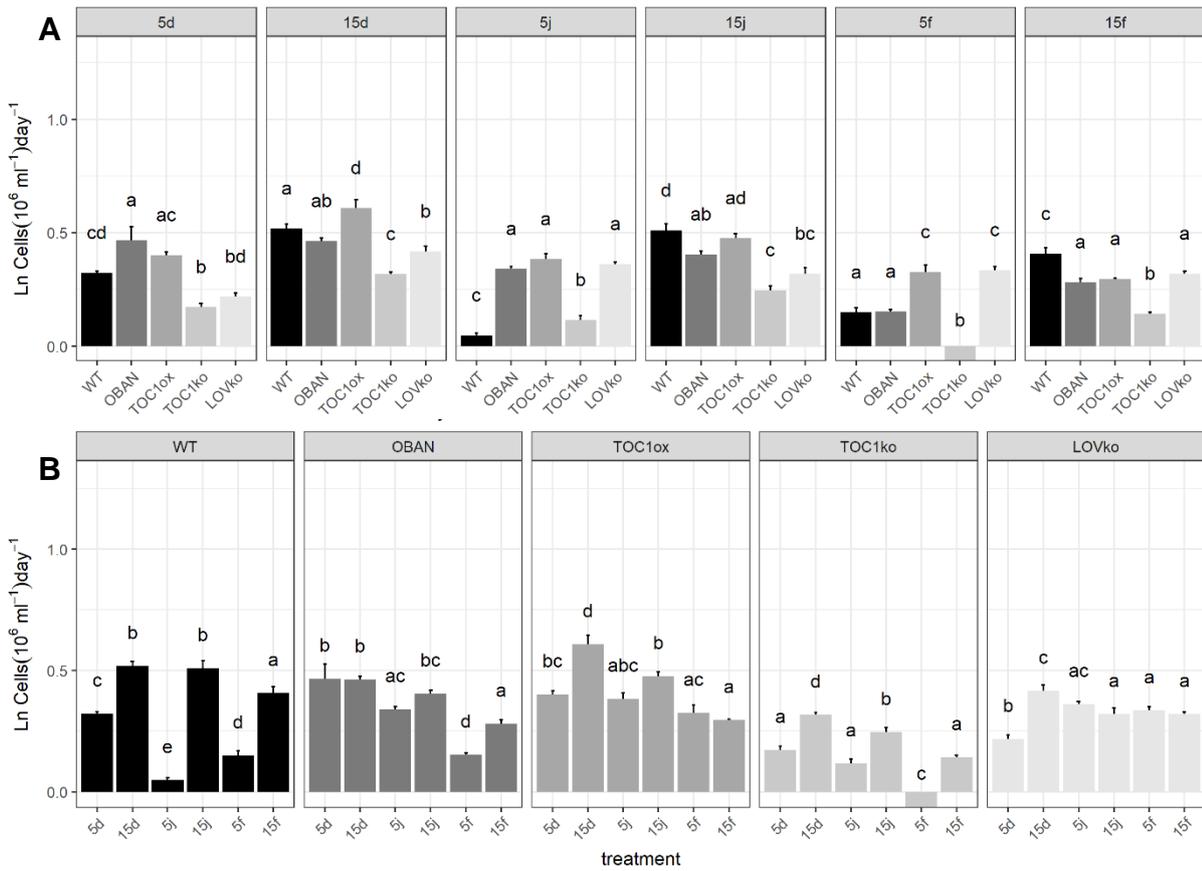


Figura 2.12. Crescimento de cada linhagem usada sob combinação múltipla de temperatura, luz e salinidade. **A)** Dados organizados por tratamentos permitem comparações entre linhagens. **B)** Dados organizados por linhagens permitem comparações entre tratamentos. Letras iguais denotam a ausência de diferença estatística pelo teste Post hoc Tukey-HSD. O p-valor de corte usado foi de 0,005. Acima de cada painel está o nome das linhagens ou teste feito: os números 5 e 15 representam salinidades testadas e as letras “d”, “j” e “f” representam as condições de luz e temperaturas dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro do ano frio, como descrito na Tabela A.2.

17. DISCUSSÃO

Neste capítulo, buscou-se avaliar como o crescimento de linhagens de *O. tauri*, que tiveram a expressão dos genes do relógio circadiano central alterada, respondia a diferentes condições médias de temperatura, salinidade e luz de anos amenos, quentes e frios onde foram registrados eflorações. Para tanto, verificou-se o crescimento de linhagens em que os genes TOC1 e LOV-HK foram deletados e uma linhagem na qual o gene TOC1 foi superexpresso.

Sabe-se que a supressão do gene LOV-HK leva a um atraso de fase do gene CCA1, mas sem mudar o período em *O. tauri* (DJOUANI-TAHRI et al., 2011). De forma similar, a supressão do gene TOC1 leva a uma arritmicidade da síntese dos transcritos de CCA1 e CAB (HEIJDE et al., 2010; MORANT et al., 2010b). Isso pode explicar as baixas taxas de crescimento das linhagens LOVko e TOC1ko (Figura 2.4), uma vez que alterações no relógio biológico de *Arabidopsis*, que o dessincronize dos ciclos externos, leva menores taxas de acúmulo de biomassa e fotossíntese (DODD et al., 2005).

Entretanto, o surpreendente crescimento de LOVko durante ano quente (Figura 2.6) mostra que a deficiência na recepção de luz pode ser compensada por um aumento de temperatura. Este fenômeno já foi visto em *Arabidopsis*, quando um mutante hipossensível à luz cresceu mais sob temperaturas quentes. Nesta planta, o fator de transcrição HFR1, após ser induzido pelo fotorreceptores CRY e PHY, atua como repressor de PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4), que por sua vez, promove a interrupção da alongação do hipocótilo durante a noite (DUEK; FANKHAUSER, 2003; ZHANG et al., 2008). Quando HFR1 é deletado, o crescimento sob temperaturas mais elevadas e luz azul é maior que na linhagem selvagem (FOREMAN et al., 2011). Como LOV-HK atua como

fotorreceptor essencial para o funcionamento do relógio circadiano (DJOUANI-TAHRI et al., 2011), sua regulação pode ser análoga ao sistema CRY/PHY/HFR1, podendo estar relacionado a fatores de crescimento celular ainda não identificados, além de integrar um sistema de percepção de mudanças de temperatura, assim como CRY/PHY plantas terrestres.

O. tauri não possui fitocromos (*PHY*), mas possui uma rodopsina-histidina quinase (*Rhod-HK*) que, junto com *LOV-HK*, compõem os únicos prováveis genes integrantes de um sistema de resposta de dois componentes, muito importante para a sinalização de mudanças ambientais em bactérias e plantas (CAPRA; LAUB, 2012). *Rhod-HK* é o único gene candidato identificado que pode participar da fotorrecepção em comprimentos de ondas mais longos (BOUGET et al., 2014; THOMMEN et al., 2015). Assim, associados ao criptocromo identificado em *O. tauri* (*CPF1*), *LOV-HK* e *Rhod-HK* permitem a percepção de variações espectrais de luz, fornecendo informações sobre profundidade e estações do ano (DJOUANI-TAHRI et al., 2011; HEIJDE et al., 2010; THOMMEN et al., 2015). Analogicamente às plantas terrestres, esses 3 fotorreceptores também podem sinalizar mudanças de temperatura ao relógio central, permitindo o desencadeamento das eflorescências anuais de *O. tauri*.

O crescimento significativamente maior de *TOC1ox* durante temperaturas mais baixas e fotoperíodos mais longos (Figura 2.9), pode ser relacionado à interrupção do relógio circadiano. Em *O. tauri*, *TOC1* é um ativador da transcrição de *CCA1*, o qual se liga em motivos EE (Evening Element) do promotor de *TOC1*, reprimindo sua transcrição (CORELLOU et al., 2009; DJOUANI-TAHRI et al., 2010). Quando *TOC1* é superexpresso, a transcrição de *CCA1* é induzida, porém se torna arritmica sob luz constante (CORELLOU

et al., 2009). Como o mutante *TOC1ox* possui constante inibição da transcrição do gene *CCA1*, uma “noite subjetiva” constante pode ser estabelecida, dessa forma a transferência para temperaturas baixas e dias longos possa ser um desencadeador de eflorescência, assim como foi visto em mutantes com o gene *TOC1* superexpresso em *Arabidopsis*, onde a expressão do gene *CAB* fica atenuada em condições circadianas, caracterizando uma noite artificial (MAKINO et al., 2002). Entretanto, transcriptomas da linhagem *TOC1ox* de *O. tauri* precisam ser analisados em maior detalhe, sob diferentes condições de eflorescência.

A temperatura foi mais importante que o fotoperíodo, irradiância e salinidade para desencadear a eflorescência, o que contrasta com a floração de plantas, onde o fotoperíodo tem papel principal (IMAIZUMI, 2010; RIBONI et al., 2014; SHIM et al., 2017; SONG et al., 2015). De fato, a temperatura já foi descrita como o fator mais associado com as eflorescência fitoplanctônicas (BOYD et al., 2013), mas mecanismos do funcionamento deste fenômeno começam a ser detalhados em *O. tauri*.

As linhagens WT e OBAN demonstraram crescimento similar em todos os tratamentos, o que pode demonstrar que o ambiente natural de onde foram isoladas não favoreceu diferenças, já que a primeira é originária de uma laguna e a segunda de ambiente pelágico.

18. CONCLUSÃO

Confirmou-se a hipótese de que genes centrais do relógio de *Ostreococcus tauri* (*TOC1* e *LOVHK*) contribuem para uma modificação no crescimento sob diferentes condições abióticas indutoras de eflorescências. O silenciamento dos genes *TOC1* e *LOVHK* levou a uma drástica queda no crescimento de *O.tauri* em diversas condições de luz e temperatura, entretanto, percebeu-se que próximo a 12°C há maior crescimento em *LOVHK* em dias curtos. Já o gene *TOC1* se mostrou mais importante para sinalizar maior crescimento sob temperaturas mais altas e dias longos. Dessa forma, genes do relógio atuam de maneira direta na rápida indução do crescimento em diferentes condições, o que sugere um possível relógio sazonal de controle das eflorescências. Apesar da temperatura ter papel principal no do crescimento, diminuições de salinidade também induziram crescimento de mutantes deficientes de genes do oscilador central. Estes resultados são de grande importância ao mostrar que mudanças de temperatura, luz e salinidade podem estimular mudanças transcricionais no relógio biológico que culminem em maior crescimento de *O. tauri*. Portanto, a hipótese de que o relógio biológico é um dos principais mecanismos moleculares na sinalização das eflorescências algais é corroborada.

19. REFERÊNCIAS

ASCHOFF, J. **Biological Rhythms**. 2. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1984.

BEC, B. et al. Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. **Journal of Plankton Research**, v. 27, n. 9, p. 881–894, 30 ago. 2005.

BEHRENFELD, M. J. Abandoning Sverdrup's Critical Depth Hypothesis on phytoplankton blooms. **Ecology**, v. 91, n. 4, p. 977–989, abr. 2010.

BLANC-MATHIEU, R. et al. An improved genome of the model marine alga *Ostreococcus tauri* unfolds by assessing Illumina de novo assemblies. **BMC genomics**, v. 15, p. 1103, jan. 2014.

BLAUW, A. N. et al. Dancing with the tides: fluctuations of coastal phytoplankton orchestrated by different oscillatory modes of the tidal cycle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49319, 14 nov. 2012.

BOUGET, F.-Y. et al. Transcriptional versus non-transcriptional clocks: A case study in *Ostreococcus*. **Marine Genomics**, v. 14, p. 17–22, abr. 2014.

BOYD, P. W. et al. Marine phytoplankton temperature versus growth responses from polar to tropical waters--outcome of a scientific community-wide study. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63091, 2013.

CABELLO, A. M. et al. Global distribution and vertical patterns of a prymnesiophyte–cyanobacteria obligate symbiosis. **The ISME Journal**, v. 10, n. 3, p. 693–706, 25 mar. 2016.

CAPRA, E. J.; LAUB, M. T. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 325–347, 2012.

CAROPPO, C. The contribution of picophytoplankton to community structure in a Mediterranean brackish environment. **Journal of Plankton Research**, v. 22, n. 2, p. 381–397, 2000.

CERON, A. **Maricultores discutem serviço de inspeção para ostras mexilhões e mariscos**. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2016/11/16/maricultores-discutem-servico-de-inspecao-para-ostras-mexilhoes-e-mariscos/>>.

CERON, A. Secretaria da agricultura mantém interdição preventiva das áreas de cultivo de ostras e mexilhões em SC. 2016b.

CERON, A. **Secretaria da Agricultura mantém interdição dos cultivos de ostras e mariscos de Santa Catarina**. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2017/10/25/secretaria-da-agricultura-mantem->

interdicao-dos-cultivos-de-ostras-e-mariscos-de-santa-catarina/>.

CHARITON, A. A. et al. Metabarcoding of benthic eukaryote communities predicts the ecological condition of estuaries. **Environmental Pollution**, v. 203, p. 165–174, ago. 2015.

CHISWELL, S. M. Annual cycles and spring blooms in phytoplankton: Don't abandon Sverdrup completely. **Marine Ecology Progress Series**, v. 443, p. 39–50, 2011.

CHRÉTIENNOT-DINET, M.-J. et al. A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). **Phycologia**, v. 34, n. 4, p. 285–292, 1995.

CORELLOU, F. et al. Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeucaryote *Ostreococcus*. **The Plant cell**, v. 21, n. 11, p. 3436–49, nov. 2009.

COURTIES, C. et al. Smallest eukaryotic organism. **Nature**, v. 370, n. 6487, p. 255–255, 1994.

DERELLE, E. et al. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11647–52, 1 ago. 2006.

DJOUANI-TAHRI, E.-B. et al. A eukaryotic LOV-histidine kinase with circadian clock function in the picoalga *Ostreococcus*. **The Plant journal**, v. 65, n. 4, p. 578–88, fev. 2011.

DJOUANI-TAHRI, E. B. et al. Insights into the regulation of the core clock component TOC1 in the green picoeucaryote *Ostreococcus*. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 3, p. 332–5, mar. 2010.

DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5734, p. 630–3, 22 jul. 2005.

DUEK, P. D.; FANKHAUSER, C. HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. **Plant Journal**, v. 34, n. 6, p. 827–836, 2003.

DUNLAP, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks. **Cell**, v. 96, p. 271–290, 1999.

FIELD, C. B.; BEHRENFELD, M. J.; RANDERSON, J. T. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. **Science**, v. 281, n. 1998, p. 237–240, 10 jul. 1998.

FOREMAN, J. et al. Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. **The Plant Journal**, v. 65, n. 3, p. 441–452, fev. 2011.

GRIMSLEY, N. et al. Cryptic sex in the smallest eukaryotic marine green alga. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 1, p. 47–54, 2010.

HEIJDE, M. et al. Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family

from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 10, p. 1614–26, out. 2010.

HUISMAN, J.; VAN OOSTVEEN, P.; WEISSING, F. J. Species Dynamics in Phytoplankton Blooms: Incomplete Mixing and Competition for Light. **The American Naturalist**, v. 154, n. 1, p. 46–68, jul. 1999.

IMAZUMI, T. Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: time to think about location. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 1, p. 83–9, fev. 2010.

JOHNSON, P. W.; SIEBURTH, J. M. In-situ morphology and occurrence of eukaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. **Journal of Phycology**, v. 18, n. 3, p. 318–327, set. 1982.

KAHM, M. et al. Grofit: Fitting biological growth curves. **Nature Precedings**, 2010.

KELLER, M. D. et al. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 35, n. 6, p. 561, 1987.

LAMBERT, S.; BOUGET, F.-Y. **2007-2016 Time series analysis of phytoplankton community in the bay of Banyuls (SOLA)**. [s.l.] Université Pierre et Marie Curie, 2017.

LANDSBERG, J. H. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 2, p. 113–390, abr. 2002.

LE BESCOT, N. et al. Global patterns of pelagic dinoflagellate diversity across protist size classes unveiled by metabarcoding. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 609–626, fev. 2016.

LEE, S. H. et al. Six-week supplementation with Chlorella has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 26, n. 2, p. 175–83, fev. 2010.

MAHADEVAN, A. et al. Eddy-driven stratification initiates North Atlantic spring phytoplankton blooms. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6090, p. 54–8, 6 jul. 2012.

MAKINO, S. et al. The APRR1/TOC1 Quintet Implicated in Circadian Rhythms of Arabidopsis thaliana: I. Characterization with APRR1-Overexpressing Plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 1, p. 58–69, 2002.

MALVIYA, S. et al. Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 11, p. E1516–E1525, 15 mar. 2016.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: Princípios e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Edusp, 1997.

MORANT, P.-E. et al. A robust two-gene oscillator at the core of *Ostreococcus tauri*

circadian clock. **Chaos (Woodbury, N.Y.)**, v. 20, n. 4, p. 045108, dez. 2010a.

MORANT, P. E. et al. A robust two-gene oscillator at the core of *Ostreococcus tauri* circadian clock. **Chaos**, v. 20, n. 4, 2010b.

NONGKYNRIH, P.; SHARMA, V. K. Biological clocks: mechanisms and developments. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 13, n. 3–4, p. 201–17, 15 maio 1992.

O'KELLY, C. J. et al. A transient bloom of *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae) in West Neck Bay, Long Island, New York. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 5, p. 850–854, out. 2003.

PALENIK, B. et al. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7705–10, 1 maio 2007.

PITTENDRIGH, C. S.; KYNER, W. T.; TAKAMURA, T. The amplitude of circadian oscillations: Temperature dependence, latitudinal clines and the photoperiodic time measurement. **Journal of biological rhythms**, v. 6, n. 4, p. 299–313, 1991.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–48, nov. 2004.

RIBONI, M. et al. Environmental stress and flowering time: the photoperiodic connection. **Plant signaling & behavior**, v. 9, n. 7, p. e29036, 2014.

SHIM, J. S.; KUBOTA, A.; IMAIZUMI, T. Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in Arabidopsis: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 5–15, jan. 2017.

SIMAS-RODRIGUES, C. et al. Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 14, p. 4097–108, jul. 2015.

SOMMER, U.; LENGFELLNER, K. Climate change and the timing, magnitude, and composition of the phytoplankton spring bloom. **Global Change Biology**, v. 14, n. 6, p. 1199–1208, jun. 2008.

SONG, Y. H. et al. Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 441–464, 29 abr. 2015.

SONG, Y. H.; ITO, S.; IMAIZUMI, T. Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 5, p. 594–603, 2010.

SVERDRUP, H. U. On Conditions for the Vernal Blooming of Phytoplankton. **ICES Journal of Marine Science**, v. 18, n. 3, p. 287–295, 1 jan. 1953.

TAYLOR, J. R.; FERRARI, R. Shutdown of turbulent convection as a new criterion for the onset of spring phytoplankton blooms. **Limnology and Oceanography**, v. 56, n. 6, p. 2293–2307, nov. 2011.

THOMMEN, Q. et al. Probing entrainment of *Ostreococcus tauri* circadian clock by green and blue light through a mathematical modeling approach. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 65, 27 fev. 2015.

TOWNSEND, D. W. et al. Spring phytoplankton blooms in the absence of vertical water column stratification. **Nature**, v. 360, n. 6399, p. 59–62, 5 nov. 1992.

VAN OOIJEN, G. et al. Genomic transformation of the picoeukaryote *Ostreococcus tauri*. **Journal of Visualized Experiments**, n. 65, p. e4074, 13 jul. 2012.

VAQUER, A. et al. Standing stock and dynamics of picophytoplankton in the Thau Lagoon (northwest Mediterranean coast). **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 8, p. 1821–1828, dez. 1996.

WICHUK, K.; BRYNJÓLFSSON, S.; FU, W. Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae: Emerging technology and prospects. **Bioengineered**, v. 5, n. 3, p. 204–8, 2014.

WICKHAM, H. An introduction to ggplot: An implementation of the grammar of graphics in R. **Statistics**, p. 1–8, 2006.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5993, p. 796–9, 13 ago. 2010.

WINDER, M. et al. The annual cycles of phytoplankton biomass. **Philosophical transactions of the Royal Society of London.**, v. 365, n. 1555, p. 3215–26, 12 out. 2010.

WINDER, M. et al. Spring phenological responses of marine and freshwater plankton to changing temperature and light conditions. **Marine Biology**, v. 159, n. 11, p. 2491–2501, 6 nov. 2012.

WINDER, M.; CLOERN, J. E. The annual cycles of phytoplankton biomass. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 365, n. 1555, p. 3215–26, 12 out. 2010.

ZHANG, X. N. et al. HFR1 is crucial for transcriptome regulation in the cryptochrome 1-mediated early response to blue light in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, 2008.

20. CAPÍTULO 3 – Genes do relógio de *Saccharum sp* (Embryophyta, Poaceae) estão relacionados a mudanças na fotossíntese sob déficit hídrico

21. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, *Saccharum sp.*, é o produto agrícola detentor do maior índice de rendimento de biomassa, chegando a mais de 70 mil toneladas por hectare em 2014, o que a torna também a gramínea mais rentável do mundo, sendo 11x maior que o milho, segundo a FAO (Figura 3.1). Desta biomassa pode-se extrair açúcar, etanol e celulose com diversas aplicações, principalmente na indústria alimentícia e de biocombustíveis (FAO, 2017).

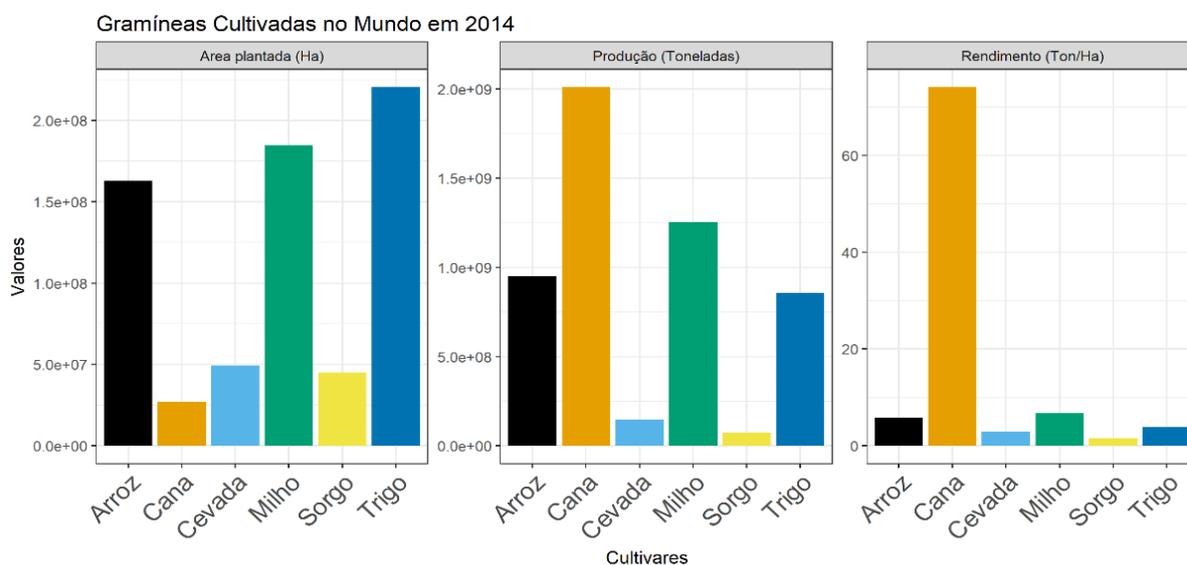


Figura 3.1. Dados da produção de 2014 das gramíneas mais cultivadas em todo o mundo. A cana-de-açúcar se destaca pelo alto rendimento da produtividade de biomassa, dados de 2014 atualizados (FAO, 2017).

A produção da safra 2016/2017 de cana-de-açúcar no Brasil foi de aproximadamente 646 milhões de toneladas, representando uma área plantada de 8,7 milhões de hectares em todo o país, o que configura cerca de 74 toneladas por hectare, ou seja, 24% a mais de rentabilidade que a média mundial (CONAB, 2017). Entretanto, uma recente instabilidade econômica tem causado uma diminuição de 60% no valor das exportações de açúcar e etanol no triênio 2014 – 2016, comparados ao triênio 2011-2013, com evidências de melhoras modestas para a safra 2017/2018 (UNICA, 2017). A crise no setor

sucroenergético brasileiro tem se mantido por bastante tempo, causada por fatores políticos e econômicos que são significativamente evidenciados por escassez de água.

A escassez de água sazonal torna necessário o desenvolvimento de diversas linhagens tolerantes ao déficit hídrico. A variedade brasileira IACSP94-2094, por exemplo, é caracterizada como resistente, produtividade média, e ótima germinação em períodos secos (LANDELL et al., 2005). Entretanto, a variedade dominante no centro-sul ainda é a RB867515 (BRAGA-JUNIOR et al., 2017), também tolerante à seca, com 27,1% da área total cultivada na safra de 2016/2017, 3x mais que a segunda mais cultivada, a RB966928. A IACSP94-2094 não está presente na lista dos 17 cultivares mais usados no centro-sul do Brasil, já que a má adaptação à colheita automatizada tem dificultado o uso desta linhagem pela indústria (BRAGA-JUNIOR et al., 2017).

Apesar da baixa representatividade na indústria, a IACSP94-2094 já se mostrou surpreendentemente resistente à deficiência de água. Após mais de 100 dias de supressão de rega, esta variedade mostrou níveis normais de ganho de biomassa, concentração de sacarose e de potencial hídrico foliar quando comparados ao tratamento irrigado e a outras linhagens, apesar da fixação de CO₂ e da taxa de transporte de elétrons da fotossíntese estarem significativamente diminuídos (MACHADO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que esta linhagem aumenta sua tolerância à seca ao longo das gerações (MARCOS; RIBEIRO, 2017).

Um dos métodos utilizados para avaliar os efeitos da dessecação em cana-de-açúcar é a adição de polietilenoglicol (PEG-8000) em cultivo hidropônico, o que induz a saída de água do sistema radicular através da diminuição do potencial osmótico da solução, simulando a baixa disponibilidade de água e permitindo um maior controle da intensidade

do estresse (LAGERWERFF, 1961; MICHEL, 1973; MONEY, 1989). Estudos feitos com trigo, arroz e batata, por exemplo, demonstraram, em diversos níveis, os efeitos do estresse osmótico por este osmólito e como esta metodologia pode ser útil para avaliação dos efeitos da deficiência hídrica (GAO et al., 2015; JI et al., 2014; KIEŁBOWICZ-MATUK et al., 2014).

Em cana-de-açúcar, a seca moderada pode estar relacionada com um maior acúmulo de sacarose e, conseqüente, antecipação do amadurecimento (CARDOZO; SENTELHAS, 2013; INMAN-BAMBER, 2004; ISKANDAR et al., 2011; PAPINI-TERZI et al., 2009). Em *Arabidopsis*, sabe-se que o acúmulo de sacarose apresenta uma dinâmica circadiana que é controlada por genes centrais do relógio biológico e sua sincronização com fatores abióticos como fotoperíodo e temperatura está intimamente relacionada com aumento de produtividade (DODD et al., 2005; FEUGIER; SATAKE, 2012; GRAF et al., 2010). Análises de transcriptomas revelaram que genes clássicos de resposta à seca, como glutaciona peroxidase e HSP70, assim como genes do relógio biológico estão diferencialmente expressos durante a supressão de rega em cana-de-açúcar (HOTTA et al., 2013; VANTINI et al., 2015) e em milho (GAO et al., 2015). Em beterraba e milho, sabe-se que o acúmulo de sacarose e a atividade de enzimas relacionadas à sua síntese possuem oscilação sazonal, com predominância no outono (CHEVALIER; SCHRADER, 1978; KENTER; HOFFMANN, 2006). Entretanto, poucos estudos foram feitos nesta área para cana-de-açúcar.

Dessa forma, é possível que a regulação circadiana do acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar esteja intimamente relacionada à intensidade e período que o déficit hídrico ocorre. Um maior conhecimento da interação do estresse de seca com os genes centrais do relógio biológico pode fornecer informações muito valiosas para o levantamento de

hipóteses sobre a periodicidade e regulação dos fatores que desencadeiam o acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar.

22. HIPÓTESE

Alterações na oscilação de parâmetros fotossintéticos sob déficit hídrico estão relacionadas com mudanças na oscilação dos genes do relógio central.

22.1. Objetivos

- 22.1.1. Testar se o ritmos circadianos de parâmetros fisiológicos se alteram sob déficit hídrico
- 22.1.2. Testar se o ritmos circadianos de genes se alteram sob déficit hídrico
- 22.1.3. Testar se há relação entre as mudanças de perfil da oscilação circadiana dos parâmetros fisiológicos e da expressão dos genes do relógio biológico

23. MATERIAIS E MÉTODOS

23.1. Cultivo de cana-de-açúcar

Para o desenvolvimento deste experimento, a infraestrutura do Centro de Ecofisiologia Biofísica da fazenda do Instituto Agronômico de Campinas foi cedida em parceria com pesquisadores Eduardo Caruso Machado (IAC) e Rafael Vasconcelos Ribeiro (UNICAMP). Toda a manipulação das plantas foi feita pelo autor com auxílio da equipe local.

Seiscentas gemas de *Saccharum sp.* Cv. IACSP94-2094, tolerante a seca, foram preparadas para germinação em substrato orgânico (Carolina Soil ® Vera Cruz, Brasil) dentro de estufa (Figura 3.2 A e B), a $24,4 \pm 6,6$ °C, 76 ± 17 % de umidade relativa do ar, irradiância de $1.200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e irrigação manual diária.

Após 2 meses, 288 mudas foram selecionadas para a hidroponia. Caixas de marfinitite pretas de 12 litros (9 plantas em cada – Figura 3.2C) com solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950; SARRUGE, 1975) (Tabela A.3). O pH foi ajustado para 5,8 e a condutividade elétrica para $1,7 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ (salinidade 0,85). Aeração intermitente (30 min) foi mantida a partir de compressores de aquário ($150 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$) adaptados a mangueiras de silicone com pedra porosa na ponta. O meio de cultura foi renovado semanalmente, de forma a dobrar a concentração dos nutrientes a cada semana, começando-se em 25%. Ao atingir 100% da concentração dos nutrientes, todas caixas foram transferidas para um Fitotron (4 x 2,5 m) sob regime de claro:escuro 12:12 e irradiância de $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 28 ± 1 °C e umidade 80% onde foram mantidas por 3 semanas sob troca semanal do meio de hidroponia.

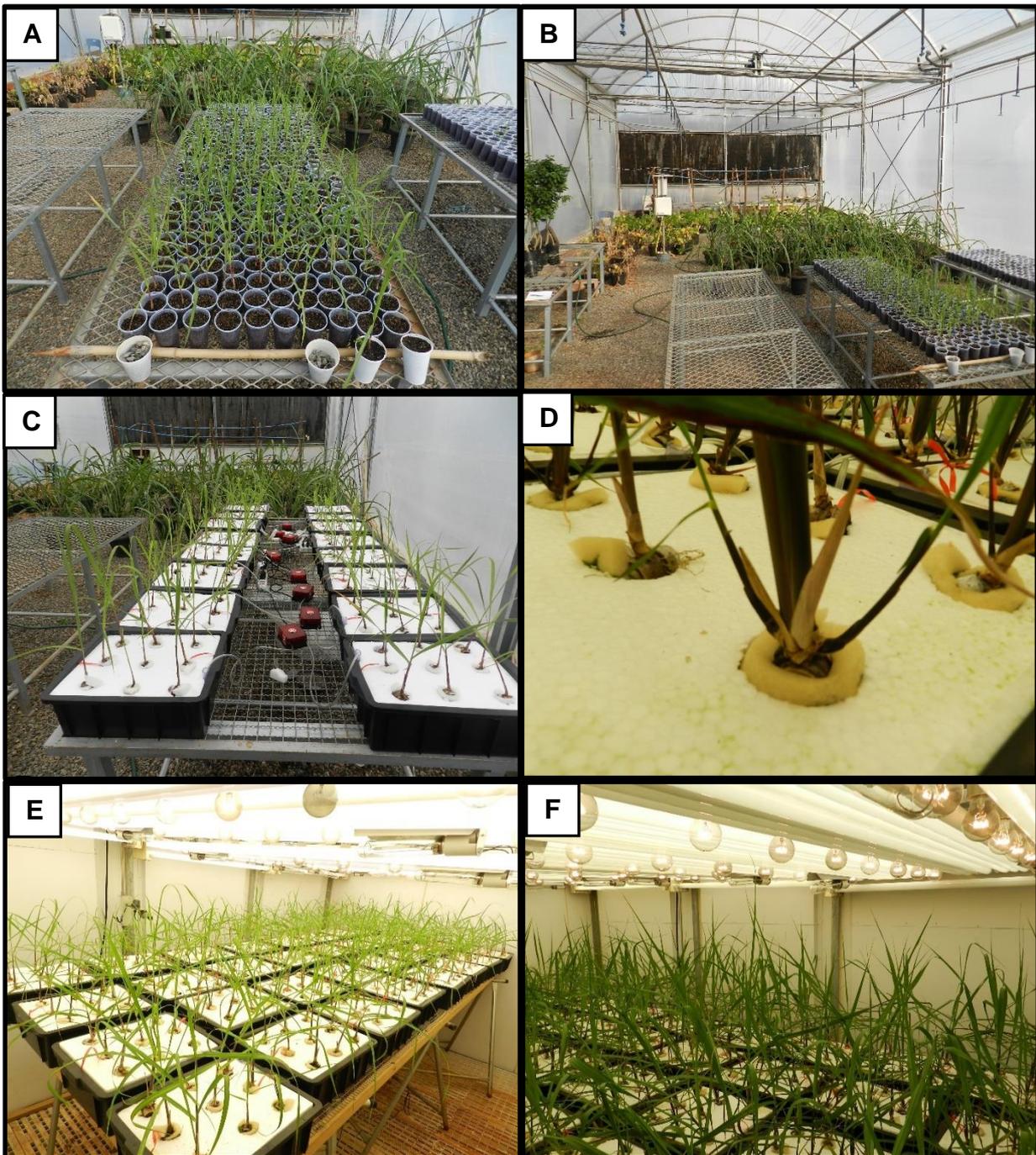


Figura 3.2. Fotos do preparo das mudas de cana-de-açúcar para o experimento circadiano. **A-B)** 600 copos plásticos de 600 ml com carolina soil e 1 gema lateral cada. As plântulas foram irrigadas 2x ao dia, manualmente dentro de uma estufa. **C)** arranjo das plantas com melhor germinação em caixas de marfinito para hidroponia. Ao centro as bombas de aeração. **D)** a adaptação das plantas ao isopor foi feita com espuma. **E)** as caixas transferidas ao Fitotron são mostradas. Os tratamentos foram distribuídos na mesa alternadamente com as bombas de aeração abaixo da mesa. **F)** as plantas prontas para a coleta circadiana.

Tabela A.3. Composição da solução nutritiva utilizada na hidroponia. Todas soluções foram diluídas em 400 litros água deionizada a cada troca de meio. Ajustou-se o pH a 5,5 com HCl puro.

Nutriente	[Inicial] (M)	[Final](μM)
Macronutrientes		
KNO ₃	2	3000
Ca(NO ₃) ₂	2	5000
KH ₂ PO ₄	2	1000
NH ₄ NO ₃	2	1000
MgSO ₄	2	2000
KCl	1,5	500
FeEDTA	2	667
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	2	8
ZnSO ₄	2	5,2
CuSO ₄	2	0,76
MnSO ₄	2	4,38
K ₂ Mo ₄ O ₃	2	11,5

Metade do lote de plantas (16 caixas) recebeu, junto com a solução nutritiva, adição gradativa (ao longo de 3 dias) de PEG-8000 (CarbowaxTM PEG-8000, Dow Chemical Comp, Midland MI, USA) visando a diminuição do potencial osmótico ($\Psi_{\text{final}} = - 0,67$ MPa). A quantidade de PEG-8000 foi calculada baseada em um modelo quadrático entre massa do polímero e potencial osmótico do meio, detectado por um psicômetro (Wescor C-52) (Figura 3.3). Em seguida, as plantas foram submetidas a condições de luz constante por 48 h.

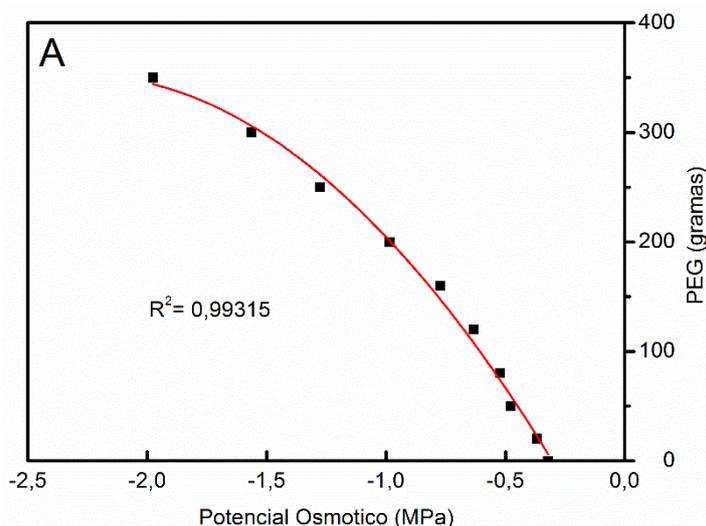


Figura 3.3. Curva de calibração da quantidade de PEG-8000 e a diminuição do potencial osmótico da solução nutritiva utilizada na hidroponia. Um ajuste a partir de um modelo quadrático gerou a seguinte equação: $y = -90,131x^2 - 411,09x - 116,37$ ($R^2 = 0,9947$), que foi utilizada para calcular a quantidade de PEG-8000 a ser usada em 192 litros de solução nutritiva (50% das caixas). Um litro de solução nutritiva foi utilizado para realizar as diluições do osmólito, adicionando-se serialmente ao mesmo volume quantidades crescentes de PEG e medição simultânea do potencial osmótico. Dessa forma, calculou-se que 30 kg de PEG-8000 seriam necessários para diminuir o potencial osmótico de 192 litros de solução nutritiva para $-0,67$ mPa.

23.2. Desenho experimental

Coletou-se 9 plantas por ponto temporal por tratamento ao longo de 48 h. Para tanto, fez-se 13 coletas temporais com intervalo de 4 h, totalizando 234 plantas. Coletou-se uma seção central da folha 0 (MCCORMICK et al., 2006), ou seja, excluiu-se cerca de 20 cm de base e ápice, de cada muda e cerca de 10 cm de raiz (brevemente secas em papel) de forma aleatória e de caixas independentes. Todas amostras foram armazenadas em tubos individuais e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas brevemente em gelo seco para transporte e em seguida em armazenamento de longo prazo em freezer -80°C . Além dessas, 18 plantas (9 para cada tratamento) foram reservadas para a medição dos parâmetros fotossintetizantes através do aparelho IRGA (infrared gas analyser), LI-6400 XT Portable Photosynthesis System (LI-COR) com luz incidente dentro da câmara do fluorímetro com irradiância de $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Nos dois primeiros dias pela manhã, o potencial hídrico de 5 folhas de cada foi medido pela bomba de Scholander para confirmar o efeito do tratamento com PEG-8000

23.3. Quantificação dos transcritos

23.3.1. Preparo e trituração dos tecidos

Todas as folhas foram trituradas individualmente em um coffee-grinder (DCG-20 Cuisinart) resfriado com gelo seco e em seguida re-trituradas em moinho de bolas (QIAGEN) de metal (100 mg de tecido e 2 bolas de 2 mm) por 1 min a 60 Hz em placas para tubos de 2 ml resfriadas a – 80°C. Para cada ponto temporal, as 9 plantas coletadas foram misturadas aleatoriamente em pools de 3 plantas, totalizando as triplicatas. Tal metodologia visou a diminuição da variação entre cada réplica.

23.3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

Utilizou-se o protocolo TRIZOL (Thermo Fisher) para a extração, com uma etapa a mais de lavagem do pellet com etanol 100% gelado e aquecimento a 60°C por 5 min após a ressuspensão em água DEPC. Para confirmação da extração e verificação de degradação, realizou-se eletroforese em gel de agarose não desnaturante a 1%, a 110 V por 40 min. Em seguida, utilizou-se a 2 U de DNase I (QIAGEN) por 30 min a 37°C acoplada à limpeza em colunas de sílica (QIAGEN) para degradar o DNA genômico remanescente e impurezas derivadas das reações prévias. O kit SuperScript® III First-Strand Synthesis supermix (Thermo Fisher) foi utilizado para síntese de cDNA seguindo o protocolo do fabricante e o Fast SYBR® Green Master mix (Thermo Fisher) para a qPCR (Tabela B.3).

Tabela B.3. Volumes e concentrações utilizados para todas as qPCRs

Solução (unidade)	[Inicial]	[Final]	Volume (μ l)
H ₂ O	-	-	1,9
PRIMERS (μ Mol)	10	0,4)	0,5
SYBR green (X)	2	1	6
cDNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	100	30	3,6
		Total	12

Utilizou-se a técnica de expressão relativa por $\Delta\Delta\text{Ct}$, usando como genes de referência α -tubulina (TUB), ATP sintase (ATP) e proteína L18 da subunidade 60S do ribossomo (RPL18). Para verificar a expressão gênica sob déficit hídrico utilizamos primers para genes conhecidos por serem induzidos nesse estresse (LEMBKE et al., 2012; PAPINI-TERZI et al., 2009; ZHOU et al., 2014) como PP2C (PROTEIN PHOSPHATASE 2C) DRP (DESICCATION-RELATED PROTEIN PCC13-62) e LIP5 (LYST-INTERACTING PROTEIN 5). Para verificação do relógio biológico central, utilizou-se primers para os genes LHY e TOC1. Todas as sequências estão descritas na tabela C.3. Utilizou-se o termociclador 7500 Real Time PCR System (Thermo-Fisher) para a reação de PCR quantitativa.

Tabela C.3. Sequências dos primers de usados no estudo obtidas no banco de sequencias e oligos SUCEST (NISHIYAMA-JR et al., 2010). ¹ Sugarcane Assembled Sequences. ² Tamanho em pb do produto de PCR.

Gene	Função	GenBank Accession	SAS ¹	Anotação	Primer	Sequencia
ScHVA22	Seca	CA126271	SCSGLR1045D05	HVA22-like protein e isoform X1	Fw 2018G02RT Rv 2018G02RT	GGTGGCAGAGGTGTGGAAAG GGTTTTGTTGGAGGGAACGA
ScLEA	Seca	CA143064	SCQSRT2031H06	late embryogenesis abundant protein, group 3	Fw 2080B02RT Rv 2080B02RT	CAATGGCAGGCACAAAGCTA TTTGCTAATCCCATGCTCATGA
ScDRP	Seca	CA275418	SCBFSD1037G05	Desiccation-related protein PCC13-62	Fw 1037G05RT Rv 1037G05RT	GCGCCAACCCCATCATC CAGCAGCCCTGCCAGAAG
ScPP2C	Seca	CA147623	SCEPRZ1011A11	protein phosphatase 2C BIPP2C1	Fw 1011A11RT Rv 1011A11RT	GAGGTGTCCAAATCAGTGCC GAGGGAAGTAGCCACCAATCG
ScLIP5	Seca	CA127571	SCACLR2007A07	Lyst Interacting Protein 5	Fw 2007A07RT Rv 2007A07RT	TGCATGCAGGTGGAACAGA CATGCATGAACCCGTGAAACA
ScLHY	Relógio	CA273226	SCEQRT3C07H05	late elongated hypotyl	CTH001_48E10_FWD CTH001_48E10_RVS	CCACCACGGCCATAAAAGAAA TGGTTTTGTTGACTTGTGATTTGG
ScTOC1	Relógio	CA167119	SCCCSB1002H04	two-component response regulator-like PRR1	CTH002_02H04_FWD CTH002_02H04_RVS	TGCCCAACCCCACTACTC CTTCGCTGGAGCAGGATATTTT
ScRPL	Referencia	CA151398	SCJFRZ2009G01	60S ribosomal protein L18-3	60S_1 60S_2	GCGAGTGCCTCACCTTTGAC TCTTAGGTCCCCTCAGCAGAAC
ScATP	Referencia	CA119541	SCCCLR1072A03	ATP synthase subunit O	ATP_1 ATP_2	GCCAAACAAATGGAGGCGTT ATCCAAAAGGCTGTTAGAATTCAAG
ScTUB	Referencia	CA146954	SCCCRZ1002H03	Tubulin alpha-3 chain	TUB1 TUB2	CGACATTGAGAGGCCCAACT GGGAAGCAGTAAAGTGATGAGATCA

24. RESULTADOS

24.1. Fisiologia da indução de déficit hídrico por PEG

A indução de potencial hídrico de $-0,67$ mPa por adição de PEG-8000 foi bem-sucedida em simular déficit hídrico. Houve diferença significativa no potencial osmótico foliar das amostras controle quando comparadas às amostras tratadas (Figura 3.4A). Além disso, através de uma curva de luz é possível observar que as amostras tratadas exibiram menor fotossíntese líquida máxima (A_{max} - taxa máxima de fixação de CO_2) e menor taxa de fixação de CO_2 por fóton incidido (alfa - inclinação inicial das curvas), o que denotou efeitos negativos significantes na fotossíntese das plantas tratadas (Figura 3.4B e Tabela D.3).

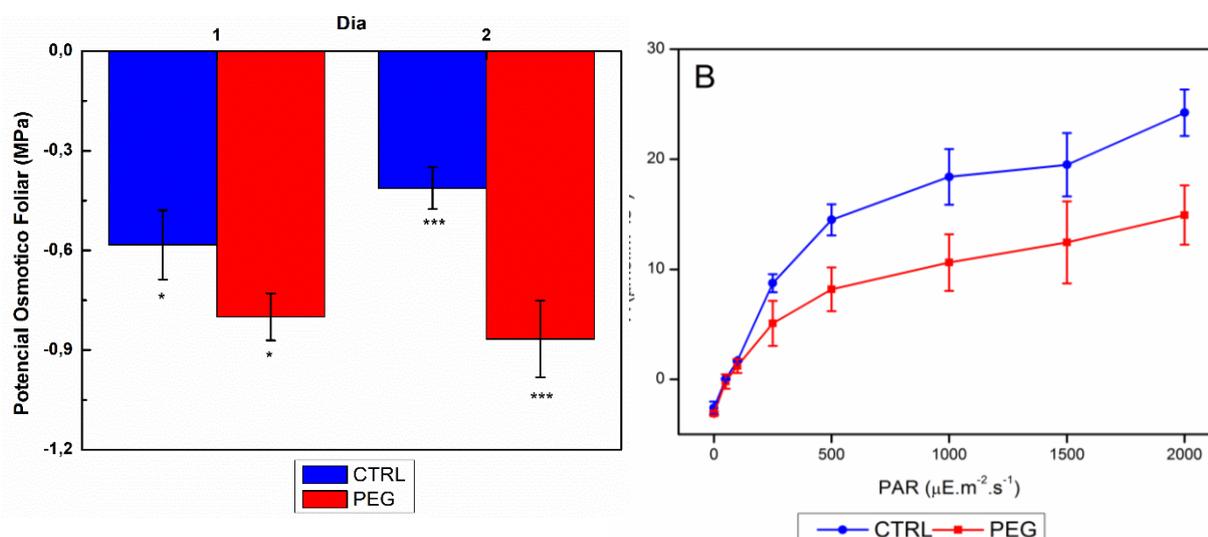


Figura 3.4. Respostas ao déficit hídrico induzido por PEG-8000 na fisiologia de cana-de-açúcar. **A)** o potencial osmótico foliar das plantas tratadas com PEG estava significativamente menor que os das plantas controle tanto no dia 1 ($p = 0,0314$) quanto no dia 2 ($p = 0,00215$). **B)** curvas de irradiância exibem perfis significativamente diferentes, com parâmetros descritos na tabela D.3.

Tabela D.3. Resumo dos parâmetros derivados das curvas de irradiância e fotossíntese líquida. Alfa é o parâmetro relacionado à inclinação da curva na fase linear (inicial) que denota a eficiência fotossintética de fixação de moléculas de CO₂ por fóton incidido, em mmol·mol⁻¹. A_{max} é a taxa máxima de fixação de CO₂. Todos parâmetros foram calculados pelo ajuste de Platt-Gallegos-Harrison (PLATT et al., 1980). Os p-valores são relativos à ANOVA feita entre os tratamentos para cada parâmetro. O valor de R² representa o grau de ajuste à equação de Platt-Gallegos-Harrison.

Tratamento	Alfa	A _{max}	R ²
Controle	42,2 ± 7,39	24,2 ± 2,1	0,89783
PEG-8000	20,48 ± 7,52	15,42 ±2,33	0,89793
P-valor	0,0235	0,00841	

Tanto a fotossíntese líquida (A), condutância estomática (G_s), conteúdo intracelular de CO₂ (C_i) e a transpiração (E) demonstraram oscilações infradianas (período > 28 h) nos dois tratamentos, sendo que as plantas tratadas demonstraram menor amplitude (Figura 3.5). O déficit hídrico induziu mudanças de fase, o que sugere perturbações no relógio biológico. Em A, houve atraso de 4 h e em G_s, E, e C_i houve adiantamentos no relógio, de 4 h, 12 h e 4 h, respectivamente (Figura 3.5).

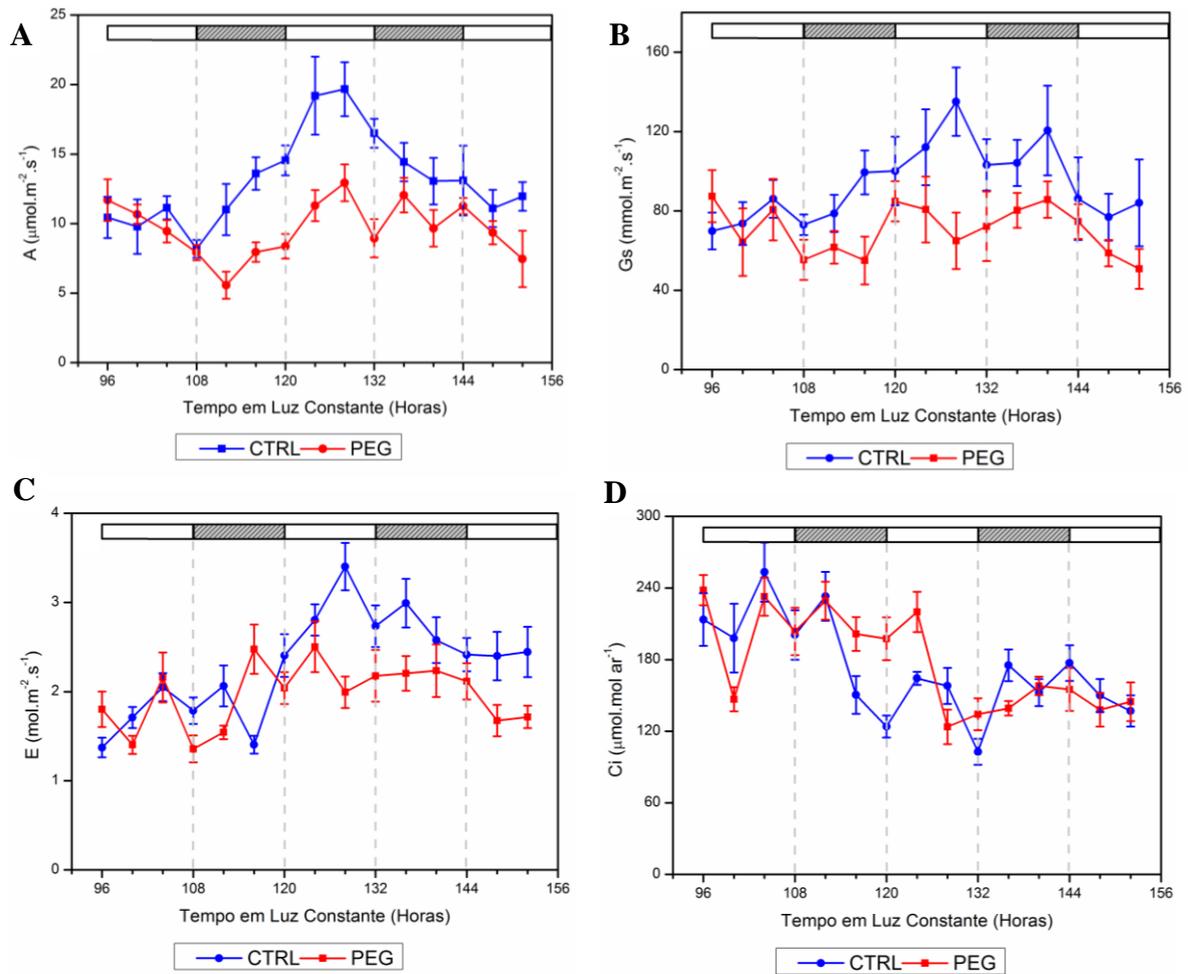


Figura 3.5. Oscilação dos parâmetros fotossintetizantes após 96h sob luz constante. As barras superiores representam período diurno (branca) e noturno (hachurada) subjetivos. Em azul estão representadas as plantas controle (n=9) e em vermelho as tratadas com PEG (n=9). **A)** Fotossíntese líquida (A). **B)** Condutância estomática (G_s). **C)** Transpiração (E). **D)** conteúdo intracelular de CO_2 (C_i). Entre **A-C** percebe-se oscilação ao longo do dia e menores taxas nas amostras tratadas. Em **D** também há oscilação ao longo do dia, entretanto não houve diferença entre os tratamentos, com exceção entre os pontos 116 e 124, onde as amostras tratadas apresentaram maior acúmulo de carbono intracelular.

24.2. Extração de RNA e RT-qPCRs

Das amostras controle, apenas 6% ficaram com qualidades baixa ($A_{260}/A_{230} < 1,8$), já nas amostras tratadas com PEG-8000, esta proporção foi 8x maior (Figura 3.6, Tabela E.3). Atribui-se essa contaminação a polifenóis e polissacarídeos, entretanto foi possível diminuir o efeito inibitório dessas moléculas a partir da diluição do RNA.

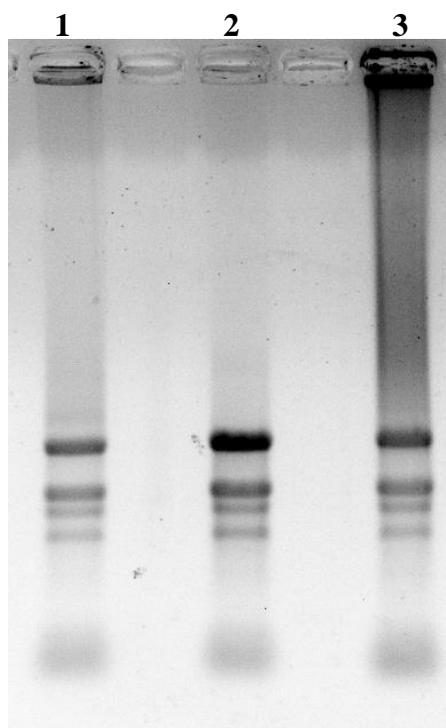


Figura 3.6. Eletroforese gel de agarose 1% com amostras de RNA de cana-de-açúcar extraídas com Trizol antes do uso da DNase I. Percebe-se bandas relativas aos RNAr 28S e 18S e a presença de DNA genômico apenas em 1 e 3. Aplicou-se 5 µg de RNA em 15 µl de volume total. Corrida a 110V por 40min.

Tabela E.3. Quantidade e qualidade dos RNAs das amostras controle (CTRL) e PEG-8000. Ambas foram divididas em 3 pools (sendo cada um com representado por 3 indivíduos). As razões $A_{260}/A_{280} < 1,8$ estão evidenciadas em vermelho.

	Pool	TIMEPOINT	[ng/uL]	260/280	260/230		Pool	TIMEPOINT	[ng/uL]	260/280	260/230		Pool	TIMEPOINT	[ng/uL]	260/280	260/230
CTRL	1	96	665,73	2,23	1,56		2	96	1228	2,28	1,88		3	96	1054	2,27	1,63
	1	100	468,14	2,15	2,46		2	100	399	2,24	1,65		3	100	1306	2,27	1,96
	1	104	55,55	1,86	1,88		2	104	208	2,17	2,46		3	104	546	2,22	1,71
	1	108	460,4	2,11	2,25		2	108	280	2,21	2,58		3	108	364,12	2,13	2,04
	1	112	206,84	1,95	3,01		2	112	1112	2,28	1,92		3	112	337	2,16	2,21
	1	116	436,12	2,18	2,04		2	116	836	2,27	1,87		3	116	168,08	1,95	2,29
	1	120	440	2,23	2,27		2	120	427,47	2,21	1,97		3	120	502	2,2	1,95
	1	124	560	2,23	2,56		2	124	612	2,26	1,87		3	124	1959	2,3	2,12
	1	128	1225	2,27	1,9		2	128	427	2,2	2,22		3	128	580	2,25	2,16
	1	132	1426	2,28	2,1		2	132	410,6	2,07	2,93		3	132	784	2,26	1,96
	1	136	657,15	2,22	1,97		2	136	265,4	2,15	2,13		3	136	469	2,24	1,29
	1	140	732,67	2,24	2,34		2	140	544,5	2,2	1,98		3	140	961,25	2,28	1,54
PEG	1	96	433,6	2,23	1,2		2	96	850	2,24	2,14		3	96	168,08	1,95	2,07
	1	100	500,34	2,11	2,69		2	100	180	2,12	2,13		3	100	206,1	1,96	1,84
	1	104	201,4	1,96	2,15		2	104	398	2,24	1,64		3	104	795,82	2,26	2,01
	1	108	442,88	2,18	2,12		2	108	745	2,25	2,13		3	108	232	1,99	2,85
	1	112	360	2,18	2,27		2	112	906,79	2,24	2,19		3	112	728,32	2,25	2,24
	1	116	400	2,22	1,72		2	116	945,53	2,27	1,5		3	116	348	2,25	0,27
	1	120	400	2,19	1,55		2	120	478	2,25	1,43		3	120	300	2,22	0,71
	1	124	360	2,14	1,53		2	124	496,2	2,11	1,99		3	124	286	2,2	1,3
	1	128	791,21	2,24	1,88		2	128	300,04	2,19	1,82		3	128	962	2,26	1,58
	1	132	464,13	2,15	1,54		2	132	679	2,23	1,39		3	132	494	2,22	1,49
	1	136	809	2,27	2,12		2	136	560	2,25	2,07		3	136	439,2	2,19	1,59
	1	140	345,49	2,21	1,59		2	140	500	2,22	1,16		3	140	419	2,23	1,47

Os efeitos transcricionais da simulação de déficit hídrico por adição de PEG-8000 revelaram que todos os genes responsivos à seca DRP, HVA22, LEA, LIP5 e PP2C apresentaram significativamente mais transcritos no tratamento que no controle, dos quais DRP e HVA22 foram mais expressos que os outros. HVA22 atingiu cerca de 25x mais transcritos que o controle (normalizado por TUB) no ponto temporal 112 h (Figura 3.7, Tabela F.3).

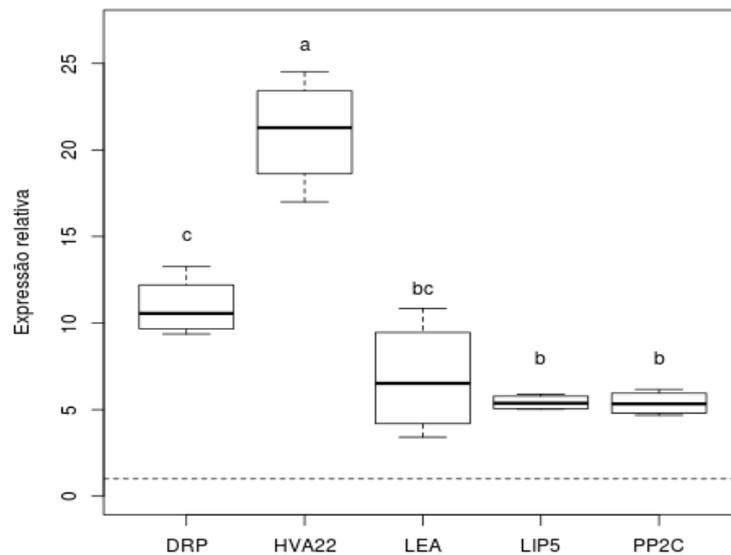


Figura 3.7. Box-plot exibindo expressão relativa ($2^{\Delta\Delta C_t}$) ao gene TUB entre amostras tratadas ($n=9$) e controle ($n=9$) no ponto temporal 112. Os 5 genes de resposta à deficiência hídrica exibiram significativamente (Tabela F.3) mais transcritos sob déficit hídrico, sendo mínimo de 5x em relação ao controle. HVA22 e DRP foram significativamente mais expressos que LIP5 e PP2C, onde HVA22 atingiu 25x mais transcritos. Letras diferentes acima das caixas representam diferença significativa. A linha tracejada representa 1x de expressão relativa.

Tabela F.3. Detalhamento do teste estatístico post-hoc Tukey-HSD (Honest significant difference) entre os genes de resposta à deficiência hídrica em cana-de-açúcar. Testes realizados comparando médias de quadruplicatas.

Comparação entre genes	p-valor
HVA22-DRP	0,0000992
LEA-DRP	0,1179116
LIP5-DRP	0,0225392
PP2C-DRP	0,0215123
LEA-HVA22	0,0000017
LIP5-HVA22	0,0000005
PP2C-HVA22	0,0000005
LIP5-LEA	0,8939437
PP2C-LEA	0,8846517
PP2C-LIP5	0,9999999

O perfil circadiano da expressão relativa de LHY e TOC1 no controle apresentou período de 20 h, entretanto as fases de expressão foram no começo da manhã e no começo da noite, respectivamente. Durante o déficit hídrico, houve perda de amplitude de expressão para LHY, com atraso de fase e manutenção do período, enquanto TOC1 foi intensamente reprimido e arritmico (Figura 3.8).

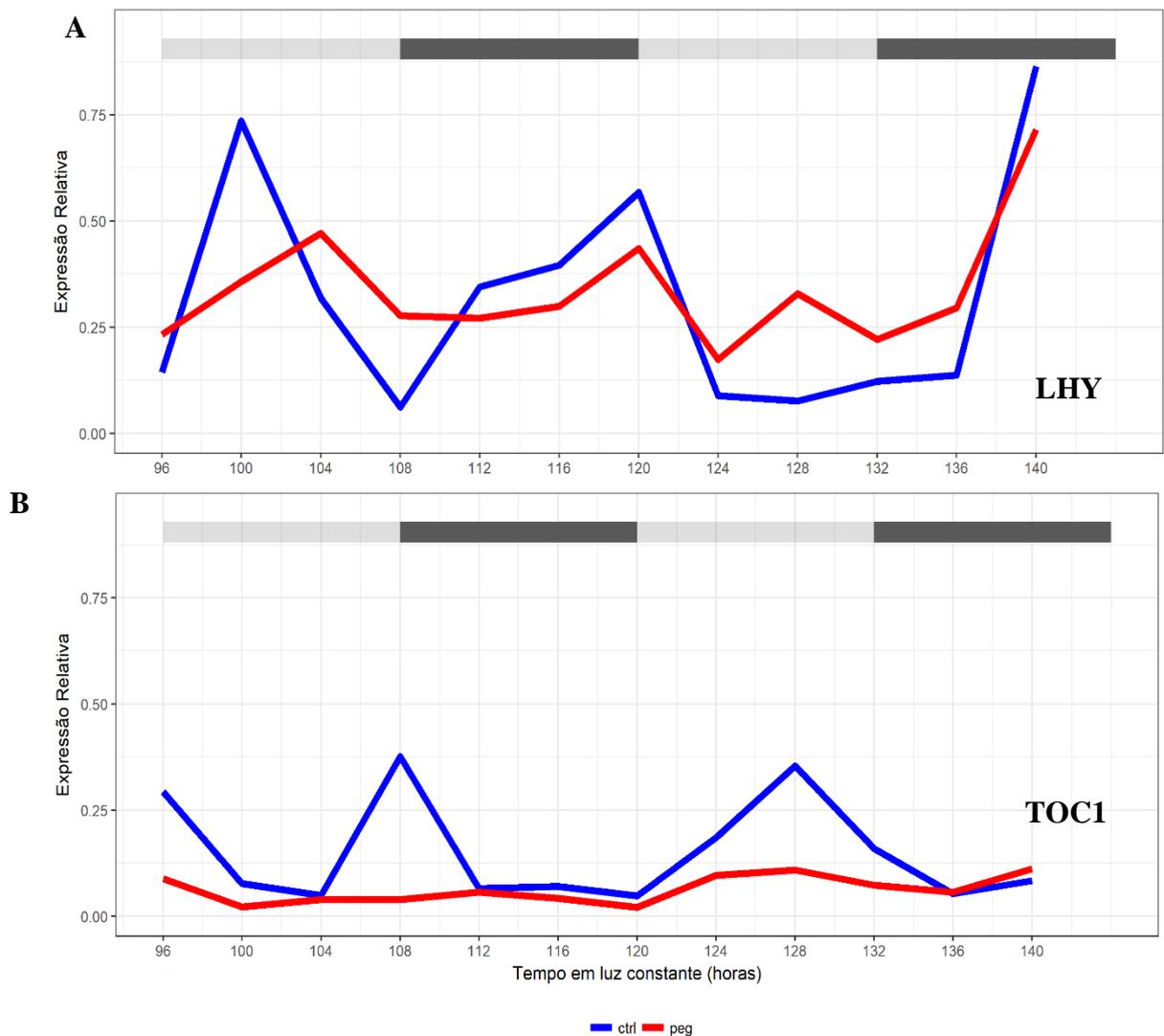


Figura 3.8. Oscilação da expressão relativa dos genes LHY e TOC1 normalizada pela expressão média de TUB e ATP de cana-de-açúcar IACSP94-2094 ao longo de 48 h sob luz constante. As barras superiores representam período diurno (cinza-claro) e noturno (cinza-escuro) subjetivos. Em azul estão representadas as plantas controle (n=9) e em vermelho as tratadas com PEG (n=9). **A)** a expressão do gene LHY demonstra oscilação com períodos de 20 horas para os dois tratamentos, com perda de amplitude e atraso de fase (pico em 100 e 120, mudados para 104 e 128, respectivamente) no tratamento com PEG (vermelho). **B)** expressão do gene TOC1 perde a oscilação circadiana e amplitude sob déficit hídrico (vermelho).

25. DISCUSSÃO

Para plantas C4, a inibição da fotossíntese sob déficit hídrico é mais explicada por fatores independentes do estômato, ou seja, não relacionado à transpiração e/ou condutância estomática (GHANNOUM, 2009; GHANNOUM et al., 2003). Portanto, a avaliação dos parâmetros fotossintetizantes, isolados, não são suficientes para explicar a razão da adaptação. Estudos de expressão gênica aliados aos parâmetros fotossintetizantes são essenciais para elucidar mecanismos de adaptação à seca em cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar é considerada uma planta sensível ao déficit hídrico. Quando comparada com sorgo, apresenta cerca de metade da taxa de crescimento foliar e transpiração sob condições limítrofes de disponibilidade de água no solo (NABLE et al., 1998). Na linhagem de cana-de-açúcar IACSP94-2094, já foi demonstrado que déficit hídrico e frio noturno podem diminuir as taxas fotossintetizantes, porém favorecer o acúmulo de sacarose em detrimento da síntese de amido (MACHADO; LAGÔA, 2014). Resultados semelhantes podem ser observados neste estudo (Figura 3.5), demonstrando que o conhecimento detalhado das respostas ao déficit hídrico pode favorecer a seleção de linhagens e manejo das condições de cultivo de cana-de-açúcar. Um exemplo disso, foi a definição dos níveis limitantes de água no solo necessários para estimular perda de área foliar, diminuição de crescimento e redução da condutividade estomática para diferentes linhagens tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico (BARBOSA et al., 2014; SMIT; SINGELS, 2006).

Os valores máximos dos parâmetros fotossintetizantes foram reduzidos pelo déficit hídrico induzido por PEG-8000 (Figura 3.5) de forma esperada quando se compara com outros estudos similares (MACHADO; LAGÔA, 2014; RIBEIRO et al., 2013). Transpiração (E) e condutância estomática (G_s) são parâmetros que influenciam diretamente a capacidade da planta de aumentar a eficiência de carboxilação, ou seja, maior fixação de CO_2 e menor quantidade de H_2O perdida (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; SILVA et al., 2012).

Este é o primeiro registro de oscilações infradianas (período de oscilação maior que 24h) de respostas fisiológicas para uma linhagem de cana-de-açúcar, além de detalhar como a fotossíntese dessa gramínea se comporta em condições de livre curso. Já se demonstrou que potencial hídrico das folhas, fotossíntese líquida, condutância estomática, taxa de expansão foliar, enzimas do metabolismo de carbono e acúmulo de sacarose e amido exibem oscilações em condições diurnas (DU et al., 2000a, 2000b; INMAN-BAMBER, 1995; ROBERTS et al., 1990). Entretanto, estudos em condições circadianas (que necessitam de luz constante) são raramente explorados por agrônomos que, em geral, buscam mimetizar ao máximo as condições ambientais naturais. Dessa forma, medidas de fotossíntese são realizadas no período da manhã e raramente os perfis diurnos são reportados. Curiosamente, viu-se que o período e as fases da taxa expansão foliar não se alteram sob diferentes níveis de intensidade de déficit hídrico, apesar de haver uma clara redução na amplitude (INMAN-BAMBER, 1995). Entretanto tal comportamento pode ter sido compensado pela temperatura, ou outros fatores, já que foi um experimento em campo. A identificação dos perfis fisiológicos que mantém ritmos circadianos sob déficit hídrico pode ser uma ferramenta muito importante para a caracterização e desenvolvimento

de linhagens mais tolerantes, entretanto experimentos circadianos mais longos precisam ser feitos, para verificar a robustez do período da oscilação.

As células guarda do estômato possuem perfis de expressão dos genes do relógio biológico diferentes da média de expressão para a folha inteira (HASSIDIM et al., 2017), assim como das raízes (JAMES et al., 2008), do tecido vascular (PARA et al., 2007) e do mesófilo (ENDO, 2016) em *Arabidopsis*. Isso pode explicar o adiantamento de fase na expressão do gene LHY entre os tratamentos (Figura 3.8), já que os perfis de oscilação de Gs também foram diferentes (Figura 3.5B). Entretanto, em soja, déficit hídrico moderado não altera o ritmo de fluorescência da clorofila e níveis severos de desidratação do solo causaram 4h de adiantamento na fluorescência da clorofila (PAN et al., 2015).

Essa diferença também pode derivar da intensa seleção de linhagens e endocruzamentos que resultaram na linhagem IACSP94-2094 (LANDELL et al., 2005). Polimorfismos nos genes do relógio que podem favorecer adaptações à diferentes ambientes já foram relatados em arroz, batata, cevada, milho e sorgo (HUNG et al., 2012; KLOOSTERMAN et al., 2013; MURPHY et al., 2011; YANG et al., 2013; ZAKHRABEKOVA et al., 2012) e sabe-se que características-chave para agricultura, como ganho de biomassa, floração e rendimento, estão intimamente relacionadas com genes centrais do relógio biológico (BENDIX et al., 2015). Assim, é possível que algumas destas mutações tenham se acumulado nos genes do relógio de IACSP94-2094 e mudado o perfil de expressão quando comparados à linhagem SP80-3280, linhagem mais utilizada para projetos de transcriptoma e genoma (DANTAS, 2017; LEMBKE et al., 2012; PAPINI-TERZI et al., 2009; SOUZA et al., 2011). Mais estudos precisam ser feitos para avaliar a influência da seleção de

linhagens tolerantes ao déficit hídrico na expressão e polimorfismos dos genes do relógio biológico.

Por ser um estresse que altera significativamente a homeostase transcricional de cana-de-açúcar (FERREIRA et al., 2012; LEMBKE et al., 2012), o nível de expressão de muitos genes se altera e a comparação relativa de expressão pelo método $\Delta\Delta C_t$ se torna complicada. Portanto, para a linhagem IACSP94-2094, diversos genes foram recentemente testados sob diferentes condições de déficit hídrico, inclusive em hidroponia com PEG-8000, e se verificou que a melhor combinação de genes de referência foi UBI1/ACT, sendo ScRPL um dos menos estáveis sob hidroponia (DE ANDRADE et al., 2017). No presente estudo, a combinação TUB/ACT se mostrou eficiente em mostrar superexpressão de genes marcadores de estresse hídrico, assim como ritmos dos genes do relógio central (Figura 3.8).

Os genes DRP, HVA22, LEA, LIP5 e PP2C, todos relacionados à tolerância à seca, foram altamente expressos no ponto temporal 112 h (Figura 3.7). Esta resposta já era esperada, já que diversos outros estudos já reportaram respostas similares para os mesmos genes, apesar de usarem abordagens diferentes (FERREIRA et al., 2017; ISKANDAR et al., 2011; LEMBKE et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2003; VANTINI et al., 2015). Isto mostra que o déficit hídrico induzido por redução do potencial osmótico em hidroponia, reproduz com robustez os mesmos efeitos transcricionais que em cultivos em campo ou em substrato sólido em casas de vegetação. O gene HVA22 atingiu 25x mais transcritos que o controle e foi significativamente maior que os outros genes de resposta à deficiência hídrica. Esta alta indução de HVA22 já foi descrita como altamente correlacionada com a produção do hormônio ácido abscísico – ABA, que acumula em altos níveis durante a seca em milho e cevada (GUO et al., 2008;

HAYANO-KANASHIRO et al., 2009; SHEN et al., 2001) e já foi relatado como diferencialmente expresso em cana-de-açúcar sob frio (NOGUEIRA et al., 2003). Por IACSP94-2094 ser uma linhagem tolerante à seca, níveis mais altos de ABA podem ser produzidos e, conseqüentemente, mais transcritos de HVA22 podem ser detectados, quando comparado com linhagens menos resistentes à desidratação. A indução deste gene por ABA estimula o acúmulo de sua proteína que culmina com a inibição do tráfego vesicular, a fim de reduzir a mobilização de proteínas para nutrição durante o desenvolvimento.

O déficit hídrico visivelmente alterou a expressão dos genes do relógio central de cana-de-açúcar (Figura 3.8). Mesmo em uma linhagem tolerante à seca, o relógio pode ser atrasado e/ou ficar arritmico em curto espaço de tempo. Sabe-se que, estresses abióticos que induzam alterações nos genes do relógio podem mudar significativamente o metabolismo e conseqüentemente a sobrevivência das plantas (ESPINOZA et al., 2010). A coordenação entre as vias metabólicas é perdida limitando a eficiência da planta nas reações que permitam a tolerância ao estresse, aumentando seus efeitos. Em *Arabidopsis*, a seca moderada não altera a expressão dos genes centrais do relógio, entretanto muda a expressão de genes expressos durante o dia (WILKINS et al., 2010). Supõe-se que níveis severos de déficit hídrico induzem repostas tanto transcricionais quanto fisiológicas que interagem com genes do relógio biológico central de forma diferente em cana-de-açúcar, quando comparada com dicotiledôneas. Como TOC1 atua como intermediador da expressão do receptor de ABA (ABAR) sob seca (LEGNAIOLI et al., 2009), alterações indiretas em LHY podem ter sido causadas por mudanças no feedback do relógio a partir de TOC1, gerando perfis de expressão incomuns.

Mais esforços ainda são necessários para o desenvolvimento de linhagens e manipulação genética de gramíneas visando a tolerância a diversos estresses, principalmente déficit hídrico. Ainda há a necessidade de explorar a interação de diversos fatores de forma controlada, assim como da avaliação de múltiplas respostas tanto em fisiologia quanto em expressão gênica, a fim de poder extrapolar mais os dados obtidos em laboratório para campo (TESTER; BACIC, 2005).

26. CONCLUSÃO

Na linhagem de cana-de-açúcar IACSP94-2094 o desempenho da fotossíntese foi suprimido sob déficit hídrico e demonstrou oscilações infradianas (período > 28 hrs) em condições de livre curso. Além disso, dessincronizaram suas fases com a oscilação da luz. Genes de resposta à deficiência hídrica foram muito mais transcritos neste tipo de abordagem, com destaque para os genes HVA22 e DRP, reafirmando sua importância como marcadores desse estresse em cana-de-açúcar. A hipótese levantada inicialmente foi confirmada, já que os genes centrais do relógio biológico TOC1 e LHY apresentaram suas fases de oscilação deslocadas e/ou amplitudes de expressão diminuídas durante déficit hídrico. Experimentos circadianos demonstraram respostas valiosas para o melhor entendimento das respostas moleculares e fisiológicas à seca. Futuramente mais experimentos como esse poderão explicar a influência da expressão gênica na fotossíntese sob déficit hídrico em cana-de-açúcar. Este tipo de abordagem pode facilitar a seleção de linhagens que possuam melhor desempenho nas condições atuais de baixa disponibilidade de água e aumento nas concentrações de CO₂.

27. REFERÊNCIAS

- BARBOSA, F. DA S. et al. Drought resistance of sugar-cane crop for different levels of water availability in the soil. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 2, p. 203–210, abr. 2014.
- BENDIX, C.; MARSHALL, C. M.; HARMON, F. G. Circadian Clock Genes Universally Control Key Agricultural Traits. **Molecular Plant**, v. 8, n. 8, 2015.
- BRAGA-JUNIOR, R. L. DO C. et al. **Censo varietal IAC de cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil - Safra 2016/2017 Série Tecnologia APTA**. Campinas: [s.n.].
- CARDOZO, N. P.; SENTELHAS, P. C. Climatic effects on sugarcane ripening under the influence of cultivars and crop age. **Scientia Agrícola**, v. 70, n. 6, p. 449–456, dez. 2013.
- CHEVALIER, P.; SCHRADER, L. E. Diurnal, seasonal, and genotypic variation of sucrose phosphate synthetase from maize leaf blades. **Plant Science Letters**, v. 12, n. 1, p. 87–91, maio 1978.
- CONAB. **Monitoramento agrícola - Cana-de-açúcar**. Brasília: [s.n.].
- DANTAS, L. L. DE B. **Caracterização do relógio biológico e seu impacto no metabolismo da cana-de-açúcar**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.
- DE ANDRADE, L. M. et al. Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 28, 17 dez. 2017.
- DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5734, p. 630–3, 22 jul. 2005.
- DU, Y.-C. et al. Diurnal Changes in Photosynthesis in Sugarcane Leaves: I. Carbon dioxide exchange rate, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels relating to the C 4 pathway and the Calvin cycle Diurnal Changes in Photosynthesis in Sugarcane Leaves I. Carbon. **Plant Prod. Sci**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 2000a.
- DU, Y.-C. et al. Diurnal Changes in Photosynthesis in Sugarcane Leaves: II. Enzyme activities and metabolite levels relating to sucrose and starch metabolism. **Plant Production Science**, v. 3, n. 1, p. 9–16, 7 jan. 2000b.
- ENDO, M. **Tissue-specific circadian clocks in plants** *Current Opinion in Plant Biology*, 2016.
- ESPINOZA, C. et al. Interaction with diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in Arabidopsis. **PLoS one**, v. 5, n. 11, p. e14101, jan. 2010.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics**.

Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country>. Acesso em: 6 dez. 2017.

FERREIRA, T. H. et al. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp.). **PLoS one**, v. 7, n. 10, p. e46703, 10 jan. 2012.

FERREIRA, T. H. S. et al. Sugarcane Water Stress Tolerance Mechanisms and Its Implications on Developing Biotechnology Solutions. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1077, 2017.

FEUGIER, F. G.; SATAKE, A. Dynamical feedback between circadian clock and sucrose availability explains adaptive response of starch metabolism to various photoperiods. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 305, 2012.

GAO, Y. et al. A maize phytochrome-interacting factor 3 improves drought and salt stress tolerance in rice. **Plant molecular biology**, v. 87, n. 4–5, p. 413–28, mar. 2015.

GHANNOUM, O. et al. Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. **New Phytologist**, v. 159, n. 3, p. 599–608, 24 jul. 2003.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635–644, 2009.

GRAF, A. et al. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9458–9463, 2010.

GUO, W.-J.; HO, T.-H.; DAVID HO, T.-H. An abscisic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells. **Plant physiology**, v. 147, n. 4, p. 1710–22, ago. 2008.

HASSIDIM, M. et al. CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) and the circadian control of stomatal aperture. **Plant physiology**, p. pp.01214.2017, 30 out. 2017.

HAYANO-KANASHIRO, C. et al. Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. **PLoS one**, v. 4, n. 10, p. e7531, 30 out. 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. [s.l.: s.n.]. v. 347

HOTTA, C. T.; NISHIYAMA, M. Y.; SOUZA, G. M. Circadian rhythms of sense and antisense transcription in sugarcane, a highly polyploid crop. **PLoS one**, v. 8, n. 8, p. e71847, jan. 2013.

HUNG, H.-Y. et al. ZmCCT and the genetic basis of day-length adaptation underlying the postdomestication spread of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. E1913–E1921, 2012.

INMAN-BAMBER, N. . Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Field Crops Research**, v. 89, n. 1, p. 107–122, set. 2004.

INMAN-BAMBER, N. G. Automatic plant extension measurement in sugarcane in relation to temperature and soil moisture. **Field Crops Research**, v. 42, n. 2–3, p. 135–142, 1 ago. 1995.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. **Water relations in sugarcane and response to water deficits**. Field Crops Research. **Anais...**2005

ISKANDAR, H. M. et al. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. **BMC plant biology**, v. 11, p. 12, jan. 2011.

JAMES, A. B. et al. The Circadian Clock in Arabidopsis Roots Is a Simplified Slave Version of the Clock in Shoots. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1832–1835, 2008.

Jl, H. et al. PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 17, p. 4863–4872, 16 jun. 2014.

KENTER, C.; HOFFMANN, C. M. Seasonal patterns of sucrose concentration in relation to other quality parameters of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 1, p. 62–70, 15 jan. 2006.

KIEŁBOWICZ-MATUK, A.; REY, P.; RORAT, T. Interplay between circadian rhythm, time of the day and osmotic stress constraints in the regulation of the expression of a *Solanum* Double B-box gene. **Annals of botany**, v. 113, n. 5, p. 831–42, abr. 2014.

KLOOSTERMAN, B. et al. Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 246–250, 2013.

LAGERWERFF, J. V. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. **Science (New York, N.Y.)**, v. 133, n. 3463, p. 1486–7, 12 maio 1961.

LANDELL, M. G. DE A. et al. **Variedades de cana-de-açúcar para o Centro-Sul do Brasil: 15º liberação do Programa Cana IAC (1959–2005)**. Campinas: [s.n.].

LEGNAIOLI, T.; CUEVAS, J.; MAS, P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. **The EMBO journal**, v. 28, n. 23, p. 3745–57, 2 dez. 2009.

LEMBKE, C. G. et al. Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. **Plant molecular biology**, v. 79, n. 4–5, p. 461–77, jul. 2012.

MACHADO, D. F. S. P.; LAGÔA, A. M. M. A. **Fotossíntese e metabolismo de carboidratos em plantas jovens de cana-de-açúcar sob baixa temperatura e deficiência hídrica**. [s.l.] Instituto Agronomico de Campinas, 2014.

MACHADO, R. S. et al. Respostas biométricas e fisiológicas ao deficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1575–1582, dez. 2009.

MARCOS, F. C. C.; RIBEIRO, R. V. **Memória de plantas de cana-de-açúcar à seca**. [s.l.] Unicamp, 2017.

MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. **New Phytologist**, v. 171, n. 4, p. 759–770, 2006.

MICHEL, B. E. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant physiology**, v. 51, n. 5, p. 914–6, maio 1973.

MONEY, N. P. Osmotic Pressure of Aqueous Polyethylene Glycols: Relationship between Molecular Weight and Vapor Pressure Deficit. **Plant physiology**, v. 91, n. 2, p. 766–9, out. 1989.

MURPHY, R. L. et al. Coincident light and clock regulation of pseudoresponse regulator protein 37 (PRR37) controls photoperiodic flowering in sorghum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 39, p. 16469–16474, 2011.

NABLE, R. O.; ROBERTSON, M. J.; BERTHELSEN, S. Response of shoot growth and transpiration to soil drying in sugarcane. **Plant and Soil**, v. 207, n. 1, p. 59–65, 1998.

NISHIYAMA-JR, M. Y. et al. The Sucest-Fun regulatory network Database: designing an energy grass. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol**, v. 27, p. 1–10, 2010.

NOGUEIRA, F. T. S. et al. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant physiology**, v. 132, n. 4, p. 1811–24, ago. 2003.

PAN, W.-J. et al. Nondestructive and intuitive determination of circadian chlorophyll rhythms in soybean leaves using multispectral imaging. **Scientific reports**, v. 5, p. 11108, 10 jun. 2015.

PAPINI-TERZI, F. S. et al. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC genomics**, v. 10, p. 120, 21 mar. 2009.

PARA, A. et al. PRR3 Is a vascular regulator of TOC1 stability in the Arabidopsis circadian clock. **The Plant cell**, v. 19, n. 11, p. 3462–73, nov. 2007.

PLATT, T.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v. 38, p. 687–701, 1980.

RIBEIRO, R. V. et al. Revealing drought-resistance and productive patterns in sugarcane genotypes by evaluating both physiological responses and stalk yield. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 02, p. 212–224, 3 abr. 2013.

ROBERTS, J. et al. Plant-water relations of sugar-cane (*Saccharum officinarum* L.) under a range of irrigated treatments. **Agricultural Water Management**, v. 17, n. 1–3, p. 95–115, 1990.

SARRUGE, J. Soluções nutritivas. **Summa phytopatologica**, v. 1, p. 231–233, 1975.

SHEN, Q. et al. The stress- and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. **Plant molecular biology**, v. 45, n. 3, p. 327–40, fev. 2001.

SILVA, P. P. DA et al. Path analysis for selection of drought tolerant sugarcane genotypes through physiological components. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 11–19, 1 maio 2012.

SMIT, M. A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, v. 98, n. 2–3, p. 91–97, 1 ago. 2006.

SOUZA, G. M. et al. The Sugarcane Genome Challenge: Strategies for Sequencing a Highly Complex Genome. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 3–4, p. 145–156, 2011.

TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. **Plant physiology**, v. 137, n. 3, p. 791–3, 1 mar. 2005.

UNICA. **Histórico de exportações mensais de etanol no brasil**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=65>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

VANTINI, J. S. et al. Differential gene expression in drought-tolerant sugarcane roots. **funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research Genet. Mol. Res**, v. 14, n. 142, p. 7196–7207, 2015.

WILKINS, O.; BRÄUTIGAM, K.; CAMPBELL, M. M. Time of day shapes Arabidopsis drought transcriptomes. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 63, n. 5, p. 715–27, set. 2010.

YANG, Q. et al. CACTA-like transposable element in ZmCCT attenuated photoperiod sensitivity and accelerated the postdomestication spread of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 42, p. 16969–16974, 2013.

ZAKHRABEKOVA, S. et al. Induced mutations in circadian clock regulator Mat-a facilitated short-season adaptation and range extension in cultivated barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4326–31, 13 mar. 2012.

ZHOU, P. et al. Characterization of gene expression associated with drought avoidance and tolerance traits in a perennial grass species. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103611, jan. 2014.

28. DISCUSSÃO GERAL

Estudos de fisiologia utilizando múltiplos modelos são raros. Entretanto, a fisiologia comparativa, ou fisiologia evolutiva, tem ganhado espaço e mostrado que, apesar de não serem tão estáveis quanto sequências nucleotídicas ou proteicas, parâmetros fisiológicos podem ser utilizados em análises filogenéticas em bactérias, anfíbios, aves, plantas e humanos (AGRAWAL, 2007; CHIARI et al., 2015; HANSON et al., 2014; KRAUSE et al., 2014; NESPOLO et al., 2017). Características fisiológicas podem sinalizar pressões seletivas e representar a variabilidade de centenas de genes simultaneamente (NOBLE, 2013).

Neste estudo, buscamos verificar a interação de oscilações circadianas com a aclimação a diferentes condições de cultivo em representantes dos 3 maiores clados de Archaeplastida: *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta), *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta) e *Saccharum spp* (Embryophyta). Para isso, medimos a oscilação de parâmetros fotossintetizantes, como fluorescência da clorofila e fotossíntese líquida, além de taxa de crescimento. Buscamos também avaliar as similaridades de sequências dos genes centrais, com foco em Rhodophyta que, comparado aos outros grupos, está bastante defasado quanto à elucidação das sequências destes genes. Hipotetizamos que, nesse grupo, há a possibilidade de que mecanismos de previsão de mudanças de condições ambientais estejam relacionados com os genes do relógio de forma a ajustar o crescimento em condições que são constantemente alteradas.

A dessecação é um estresse que está associado com diversas outras variáveis, por exemplo mudanças drásticas de temperatura e salinidade, tanto em plantas terrestres quanto em macroalgas (ALPERT, 2005b; BOHNERT, 2000; HOEKSTRA et al., 2001a; PROCTOR; TUBA, 2002). Entretanto, em alguns casos a baixa

disponibilidade de água é acompanhada por mudanças de qualidade e quantidade de luz, no caso de plantas que passam por seca sazonal, ou as macroalgas em regiões entre-marés que podem ser expostas até duas vezes por dia a um ambiente hostil, quando comparado ao estável ambiente submerso (GUENTHER; MARTONE, 2014; SAMPATH-WILEY et al., 2008; SHAFER et al., 2007; TOMANEK; HELMUTH, 2002).

Estudos relacionando fotoperiodismo e crescimento em macroalgas tem sido feitos há mais de 20 anos (AGUILERA et al., 1997; ESCASSI et al., 2002; LÜNING, 1990, 1994, 2001; LÜNING et al., 1997; MAKAROV et al., 1995; SCHUBERT et al., 2004; TITLYANOV et al., 1996). Todos esses estudos utilizaram ferramentas automáticas de medição do ritmicidade em macroalgas em diferentes condições de luz e temperatura após intensa padronização. Entretanto, mecanismos básicos de controle dos ritmos de crescimento em Rhodophyta ainda são pouco conhecidos, principalmente em representantes do grupo Florideophyceae, o mais derivado evolutivamente e mais explorado economicamente.

A medição automática do crescimento também pode ser adaptada para medir o crescimento circadiano de cana-de-açúcar (INMAN-BAMBER, 1995). Apesar de intensa caracterização fisiológica do ponto de vista da fotossíntese, mecanismos bioquímicos basais controlados pelo relógio ainda continuam pouco explorados e cada vez mais técnicas automáticas para medição de ritmos serão necessárias. Mais estudos em laboratório são necessários em cana-de-açúcar para comparação com dados de campo que, apesar de possuírem alta variabilidade, refletem mais precisamente as condições reais, evidenciando mais interesse para a produção industrial e seleção de linhagens. Mostramos que a simulação de déficit hídrico por diminuição do potencial osmótico em hidroponia reproduz dados já revelados em

campo, o que diminui a distância entre dados de campo e os dados de laboratório. Além disso, linhagens adaptadas à seca podem ser selecionadas com foco nos genes do relógio biológico, já que adiantamento de fase e de amplitude na oscilação do gene CCA1 foram detectadas quando o déficit hídrico foi simulado em hidroponia (Figura 3.8A).

Proteínas capazes de sinalizar simultaneamente variações sutis no comprimento de onda, irradiância e temperatura ao metabolismo são a principal ferramenta que auxilia plantas a prever alterações meteorológicas. A efloração sazonal de fitoplânctons pode possuir um mecanismo similar ao florescimento de plantas, esse estudo fornece evidências da existência um mecanismo homólogo a plantas de controle do crescimento a partir do relógio biológico em Chlorophyta. Esta hipótese é suportada pela similaridade de sequências entre os genes do relógio, fotorreceptores e genes do ciclo celular entre *Ostreococcus tauri* e *Arabidopsis thaliana* (DJOUANI-TAHRI et al., 2011; MOULAGER et al., 2007; SULLIVAN et al., 2016), além dos dados de crescimento diferencial em condições simuladas de irradiância, fotoperíodo, temperatura e salinidade, aqui evidenciados.

O crescimento de *O. tauri* pode ser alterado por estímulos frio noturno (TOC1-ox) durante períodos de dias longos. Este resultado é amplamente suportado pelas séries temporais da quantificação de células e OTUs em alto mar (LAMBERT; BOUGET, 2017). Não muito diferente, a expressão de genes de ciclo celular e a fotossíntese de algumas plantas podem ser aumentados após noites frias (RYMEN et al., 2007; SAWICKI et al., 2015). É racional dizer que, apesar da distância filogenética, existem respostas fisiológicas, quanto ao crescimento e expressão de genes do relógio, que estão conservadas em Archaeplastida. Entretanto, transcriptomas circadianos são

necessários para medir a expressão rítmica de genes associados a alterações condições ambientais em Rhodophyta.

A comparação de 3 organismos tão diferentes se mostrou bastante útil para o desenvolvimento de hipóteses. *G. tenuistipitata*, por ser uma alga que habita regiões entre-marés pode ter desenvolvido mecanismos diários de prevenção e/ou remediação da seca, o que pode ser muito importante para estudos de desenvolvimento e fisiologia neste grupo de eucariotos fotossintetizantes. Além disso, a identificação de genes ou metabólitos que respondem diariamente à seca em algas podem servir de alvos ou transferidos em plantas terrestres, como cana-de-açúcar. Esta gramínea possui um enorme histórico de pesquisas em efeitos sazonais de luz, temperatura e umidade no ganho de biomassa e produção de metabólitos secundários, entretanto sua baixa flexibilidade para experimentação em laboratório prejudica a elucidação de mecanismos. Já em *O. tauri*, diversas ferramentas genéticas e de biologia celular somadas à facilidade de cultivo e avaliação de fenótipos a tornam um excelente modelo para testes de hipóteses e análise simultânea do efeito de múltiplas variáveis no crescimento e na regulação dos genes centrais relógio circadiano.

29. CONCLUSÕES GERAIS

A hipótese de que há conservação de respostas do relógio ao estresse em Archaeplastida não pôde ser confirmada. Não foi possível encontrar padrões comparáveis de respostas do relógio nos 3 modelos utilizados. Entretanto, *Gracilaria tenuistipitata* exibiu oscilações circadianas robustas da fluorescência da clorofila e de crescimento. Essa macroalga exibe superexpressão do gene TRX quando exposta à dessecação moderada, o que pode explicar a manutenção do crescimento durante a reidratação. Em *Ostreococcus tauri*, dias longos com temperatura baixa durante a noite pode desencadear eflorescências (maior crescimento de TOC1-ox), assim como de salinidades baixas (maior crescimento de Δ LOVHK). Parâmetros fotossintetizantes de cana-de-açúcar não oscilam de maneira circadiana sob déficit hídrico, em linhagem adaptada à baixa disponibilidade de água. O gene HVA-22 é um marcador de estresse hídrico já que é altamente expresso em baixo potencial osmótico. Os genes do relógio de cana-de-açúcar também alteram sua oscilação da expressão, sendo que o gene TOC1 é mais afetado que o gene LHY.

Em *G.tenuistipitata*, novos experimentos associando dessecação e alterações em marcadores do relógio precisam ser feitos, assim como uma busca detalhada de candidatos aos genes centrais em Rhodophyta. Em *O.tauri*, mais genes do relógio precisam ser analisados sob uma combinação múltipla de condições indutoras de eflorescências. Em cana-de-açúcar, uma busca de polimorfismos nos genes centrais do relógio na linhagem IACSP9024-94 pode explicar o efeito da seleção artificial na tolerância à dessecação.

Portanto, os três organismos estudados exibiram ajustes sensíveis em marcadores do relógio biológico ao serem expostos a mudanças abióticas. Este estudo expande o

conhecimento de que o mecanismo de controle do tempo é responsivo a alterações ambientais, mostrando isso em diferentes representantes do grupo Archaeplastida.

30. REFERENCIAS

- ABE, M. FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. **Science**, v. 309, n. 5737, p. 1052–1056, 2005.
- ADL, S. M. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399–451, 2005.
- ADL, S. M. et al. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429–493, 2012.
- AGRAWAL, A. A. Macroevolution of plant defense strategies. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 2, p. 103–9, 1 fev. 2007.
- AGUILERA, J.; FIGUEROA, F.; NIELL, F. X. Photocontrol of short-term growth in *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta). **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 4, p. 417–424, 26 nov. 1997.
- ALABADÍ, D. et al. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5531, p. 880–3, 3 ago. 2001.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integr. Comp. Biol.**, v. 45, p. 685–695, 2005a.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. **Integrative and comparative biology**, v. 45, n. 5, p. 685–95, 1 nov. 2005b.
- ASCHOFF, J. **Biological Rhythms**. 2. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1984.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. [s.l.] CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
- BELL-PEDERSEN, D. et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nature Reviews: Genetics**, v. 6, n. 7, p. 544–556, 2005.
- BENLLOCH, R. et al. Integrating long-day flowering signals: A LEAFY binding site is essential for proper photoperiodic activation of APETALA1. **Plant Journal**, v. 67, n. 6, p. 1094–1102, 2011.
- BEWLEY, J. D. Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: Protein Synthesis in Relation to Desiccation and a Potential Role for Protection and Repair Mechanisms. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Eds.). **Water and Life**. 1. ed. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992. p. 141–160.
- BHATTACHARYA, A.; KHANALE, V.; CHAR, B. Plant circadian rhythm in stress signaling. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 147–155, 2017.

BOHNERT, H. J. What makes desiccation tolerable? **Genome biology**, v. 1, n. 2, p. 4, 2000.

BRODIE, J. et al. The algal revolution. **Trends in plant science**, v. 22, n. 8, p. 726–738, 2017.

CARRÉ, I.; KIM, J.-Y. MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 374, p. 1551–1557, 1 jul. 2002.

CELLIER, F.; CONÉJÉRO, G.; CASSE, F. Dehydrin transcript fluctuations during a day/night cycle in drought-stressed sunflower. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 343, p. 299–304, fev. 2000.

CHIARI, Y. et al. Phylogenetic signal in amphibian sensitivity to copper sulfate relative to experimental temperature. **Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America**, v. 25, n. 3, p. 596–602, abr. 2015.

CHOW, B. Y. et al. ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the *Arabidopsis* circadian clock. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 2, 2012.

CORELLOU, F. et al. Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeukaryote *Ostreococcus*. **The Plant cell**, v. 21, n. 11, p. 3436–49, nov. 2009.

DAI, S. et al. BROTHER OF LUX ARRHYTHMO Is a Component of the *Arabidopsis* Circadian Clock. **The Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 961–972, 2011.

DJOUANI-TAHRI, E.-B. et al. A eukaryotic LOV-histidine kinase with circadian clock function in the picoalga *Ostreococcus*. **The Plant journal**, v. 65, n. 4, p. 578–88, fev. 2011.

DJOUANI-TAHRI, E. B. et al. Insights into the regulation of the core clock component TOC1 in the green picoeukaryote *Ostreococcus*. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 3, p. 332–5, mar. 2010.

DODD, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5734, p. 630–3, 22 jul. 2005.

DODD, A. N. et al. Interactions between circadian clocks and photosynthesis for the temporal and spatial coordination of metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

DUNLAP, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks. **Cell**, v. 96, p. 271–290, 1999.

DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. Yes, circadian rhythms actually do affect almost everything. **Cell Research**, v. 26, n. 7, p. 759–760, 31 jul. 2016.

ENDO, M. et al. PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING accelerates flowering through physical interactions with phytochrome B and CONSTANS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. 18017–18022, 29 out. 2013.

ENDO, M. **Tissue-specific circadian clocks in plants** *Current Opinion in Plant Biology*, 2016.

ERIKSSON, M. E.; MILLAR, A. J. The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. **Plant physiology**, v. 132, n. 2, p. 732–8, jun. 2003.

ESCASSI, L. et al. Potassium drives daily reversible thallus enlargement in the marine red alga *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta). **Planta**, v. 214, n. 5, p. 759–66, mar. 2002.

FARRÉ, E. M.; LIU, T. The PRR family of transcriptional regulators reflects the complexity and evolution of plant circadian clocks. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 5, p. 621–629, out. 2013.

FOSTER, R. G.; HANKINS, M. W.; PEIRSON, S. N. Light, Photoreceptors, and Circadian Clocks. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 362p. 3–28.

FU, W. et al. Algal Cell Factories: Approaches, Applications, and Potentials. **Marine drugs**, v. 14, n. 12, 13 dez. 2016.

FUJIWARA, S. et al. Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 20, n. 11, p. 2960–71, nov. 2008.

GARDNER, M. J. et al. How plants tell the time. **The Biochemical journal**, v. 397, n. 1, p. 15–24, 1 jul. 2006.

GENDRON, J. M. et al. Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 8, p. 3167–72, 21 fev. 2012.

GOLDEN, S. S.; STRAYER, C. Time for plants. Progress in plant chronobiology. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 98–101, jan. 2001.

GREEN, R. M.; TOBIN, E. M. The role of CCA1 and LHY in the plant circadian clock. **Developmental cell**, v. 2, n. 5, p. 516–8, maio 2002.

GRUNDY, J.; STOKER, C.; CARRÉ, I. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 27 ago. 2015.

GUENTHER, R. J.; MARTONE, P. T. Physiological performance of intertidal coralline algae during a simulated tidal cycle. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 310–321, 12 abr. 2014.

HANAOKA, M. et al. RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 31, p. 26321–26327, 2012.

HANSON, K. L.; HRVOJ-MIHIC, B.; SEMENDEFERI, K. A Dual Comparative Approach: Integrating Lines of Evidence from Human Evolutionary Neuroanatomy and Neurodevelopmental Disorders. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 84, n. 2, p. 135–155, 2014.

HARDIN, P. E.; HALL, J. C.; ROSBASH, M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. **Nature**, v. 343, n. 6258, p. 536–540, 1990.

HARMER, S. L. The Circadian System in Higher Plants. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 357–377, 28 abr. 2009.

HEIJDE, M. et al. Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 10, p. 1614–26, out. 2010.

HELPER, A. et al. LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the Arabidopsis core clock. **Current Biology**, v. 21, n. 2, p. 126–133, 2011.

HEMMES, H. et al. Circadian Clock Regulates Dynamic Chromatin Modifications Associated with Arabidopsis CCA1/LHY and TOC1 Transcriptional Rhythms. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 12, p. 2016–2029, dez. 2012.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, p. 431–438, 2001a.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001b.

ICHIKAWA, K. et al. The plastid sigma factor SIG5 is involved in the diurnal regulation of the chloroplast gene psbD in the moss *Physcomitrella patens*. **FEBS Letters**, v. 582, n. 3, p. 405–409, 2008.

INMAN-BAMBER, N. G. Automatic plant extension measurement in sugarcane in relation to temperature and soil moisture. **Field Crops Research**, v. 42, n. 2–3, p. 135–142, 1 ago. 1995.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. Seaweed as a Source of Novel Nutraceuticals. In: **Advances in food and nutrition research**. [s.l.: s.n.]. v. 64p. 325–337.

KAISER, T. S.; NEUMANN, D.; HECKEL, D. G. Timing the tides: genetic control of diurnal and lunar emergence times is correlated in the marine midge *Clunio marinus*. **BMC genetics**, v. 12, p. 49, jan. 2011.

KEELING, P. J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1541, p. 729–48, 12 mar. 2010.

KEHOE, D. M. et al. Two 10-bp regions are critical for phytochrome regulation of a *Lemna gibba* Lhcb gene promoter. **The Plant cell**, v. 6, n. 8, p. 1123–34, ago. 1994.

KENIGSBUCH, D.; TOBIN, E. M. A region of the *Arabidopsis* Lhcb1*3 promoter that binds to CA-1 activity is essential for high expression and phytochrome regulation. **Plant physiology**, v. 108, n. 3, p. 1023–7, jul. 1995.

KIEŁBOWICZ-MATUK, A.; REY, P.; RORAT, T. Interplay between circadian rhythm, time of the day and osmotic stress constraints in the regulation of the expression of a *Solanum Double B-box* gene. **Annals of botany**, v. 113, n. 5, p. 831–42, abr. 2014.

KIM, S. Y.; YU, X.; MICHAELS, S. D. Regulation of CONSTANS and FLOWERING LOCUS T expression in response to changing light quality. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 269–79, set. 2008.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. **A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance**. Integrative and Comparative Biology. **Anais...**2005

KRAUSE, S. et al. Weak phylogenetic signal in physiological traits of methane-oxidizing bacteria. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, n. 6, p. 1240–1247, jun. 2014.

KUHLMAN, S. J.; CRAIG, L. M.; DUFFY, J. F. Introduction to Chronobiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2017.

LAI, A. G. et al. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 17129–17134, 16 out. 2012.

LAMBERT, S.; BOUGET, F.-Y. **2007-2016 Time series analysis of phytoplankton community in the bay of Banyuls (SOLA)**. [s.l.] Université Pierre et Marie Curie, 2017.

LEGNAIOLI, T.; CUEVAS, J.; MAS, P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. **The EMBO journal**, v. 28, n. 23, p. 3745–57, 2 dez. 2009.

LI, S. The *Arabidopsis thaliana* TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. **Plant signaling & behavior**, v. 10, n. 7, p. e1044192, 2015.

LIU, H. et al. *Arabidopsis* CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17582–7, 22 out. 2013.

LU, S. X. et al. CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL Function Synergistically in the Circadian Clock of Arabidopsis. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 150, n. 2, p. 834–843, 2009.

LÜNING, K. Light as an environmental signal. In: **Seaweeds: Their environment, biogeography and ecophysiology**. [s.l.: s.n.]. p. 411.

LÜNING, K. Circadian growth rhythm in juvenile sporophytes of Laminariales (Phaeophyta). **Journal of Phycology**, v. 30, n. 2, p. 193–199, abr. 1994.

LÜNING, K. Circadian growth in *Porphyra umbilicalis* (Rhodophyta): spectral sensitivity of the circadian system. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 1, p. 52–58, 6 fev. 2001.

LÜNING, K.; TITLYANOV, E.; TITLYANOVA, T. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. III. The red alga *Porphyra umbilicalis*. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 2, p. 167–173, 3 maio 1997.

MAKAROV, V. N.; SCHOSCHINA, E. V.; LÜNING, K. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. I. Juvenile sporophytes of Laminariales (Phaeophyta). **European Journal of Phycology**, v. 30, n. 4, p. 261–266, 17 nov. 1995.

MEHTA, P. A. et al. A diurnally regulated dehydrin from *Avicennia marina* that shows nucleo-cytoplasmic localization and is phosphorylated by Casein kinase II in vitro. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 47, n. 8, p. 701–9, ago. 2009.

MIKKELSEN, M. D.; THOMASHOW, M. F. A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 60, n. 2, p. 328–339, out. 2009.

MILLAR, A. J. et al. Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5201, p. 1161–3, 24 mar. 1995.

MILLAR, A. J. A suite of photoreceptors entrains the plant circadian clock. **J Biol Rhythms**, v. 18, n. 3, p. 217–226, 2003.

MITTAG, M.; KIAULEHN, S.; JOHNSON, C. H. The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? **Plant physiology**, v. 137, n. 2, p. 399–409, fev. 2005.

MITTAG, M.; WAGNER, V. The circadian clock of the unicellular eukaryotic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biological chemistry**, v. 384, n. 5, p. 689–95, maio 2003.

MIZOGUCHI, T. et al. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. **Developmental Cell**, v. 2, n. 5, p. 629–641, 2002.

MONNIER, A. et al. Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles. **BMC genomics**, v. 11, p. 192, jan. 2010.

MORANT, P.-E. et al. A robust two-gene oscillator at the core of *Ostreococcus tauri* circadian clock. **Chaos (Woodbury, N.Y.)**, v. 20, n. 4, p. 045108, dez. 2010.

MOULAGER, M. et al. Light-dependent regulation of cell division in *Ostreococcus*: evidence for a major transcriptional input. **Plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 1360–9, jul. 2007.

NAGASHIMA, A. et al. The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the psbD Blue Light-Responsive Promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 4, p. 357–368, 2004.

NAGEL, D. H. et al. Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 34, p. E4802–E4810, 2015.

NESPOLO, R. F. et al. Aerobic power and flight capacity in birds: a phylogenetic test of the heart-size hypothesis. **The Journal of experimental biology**, 17 nov. 2017.

NIKLAS, K. J. The evolutionary-developmental origins of multicellularity. **American journal of botany**, v. 101, n. 1, p. 6–25, jan. 2014.

NITSCHKE, S. et al. Circadian Stress Regimes Affect the Circadian Clock and Cause Jasmonic Acid-Dependent Cell Death in Cytokinin-Deficient *Arabidopsis* Plants. **The Plant Cell**, p. tpc.00016.2016, 2016.

NOBLE, D. Physiology is rocking the foundations of evolutionary biology. **Experimental Physiology**, v. 98, n. 8, p. 1235–1243, 2013.

NONGKYNRIH, P.; SHARMA, V. K. Biological clocks: mechanisms and developments. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 13, n. 3–4, p. 201–17, 15 maio 1992.

NOORDALLY, Z. B. et al. Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6125, p. 1316–9, 15 mar. 2013.

OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 85–100, 2000.

PFEUTY, B. et al. Circadian clocks in changing weather and seasons: Lessons from the picoalga *Ostreococcus tauri*. **BioEssays**, v. 34, n. 9, p. 781–90, set. 2012.

PITTENDRIGH, C. S.; TAKAMURA, T. Temperature dependence and evolutionary adjustment of critical night length in insect photoperiodism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 20, p.

7169–73, out. 1987.

PROCTOR, M. C. F.; TUBA, Z. **Poikilohydry and homoihydry: Antithesis or spectrum of possibilities?** *New Phytologist*, 2002.

PRUNEDA-PAZ, J. L. et al. A Functional Genomics Approach Reveals CHE as a Component of the Arabidopsis Circadian Clock. **Science**, v. 323, n. 5920, p. 1481–1485, 2009.

RAPOSO, M. DE J.; MORAIS, A.; MORAIS, R. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 27, 28 jan. 2016.

RYMEN, B. et al. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. **Plant physiology**, v. 143, n. 3, p. 1429–38, mar. 2007.

SAMPATH-WILEY, P.; NEEFUS, C. D.; JAHNKE, L. S. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützting (Rhodophyta, Bangiales). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 361, n. 2, p. 83–91, jul. 2008.

SANCHEZ, S. E.; KAY, S. A. The plant circadian clock: From a simple timekeeper to a complex developmental manager. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 12, 2016.

SAWICKI, M. et al. Cold-night responses in grapevine inflorescences. **Plant Science**, v. 239, p. 115–127, out. 2015.

SCHUBERT, H. et al. Circadian rhythm of photosynthesis in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): independence of the cell cycle and possible photosynthetic clock targets. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 4, p. 423–430, nov. 2004.

SCHULZE, T. et al. How the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* keeps time. **Protoplasma**, v. 244, n. 1–4, p. 3–14, ago. 2010.

SEO, P. J.; MAS, P. **STRESSing the role of the plant circadian clock** *Trends in Plant Science*, 2015.

SHAFER, D. J.; SHERMAN, T. D.; WYLLIE-ECHEVERRIA, S. Do desiccation tolerances control the vertical distribution of intertidal seagrasses? **Aquatic Botany**, v. 87, p. 161–166, 2007.

SHIM, J. S.; KUBOTA, A.; IMAIZUMI, T. Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in Arabidopsis: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 5–15, jan. 2017.

SONG, Y. H. et al. Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 441–464, 29 abr. 2015.

SULLIVAN, S. et al. Functional characterization of *Ostreococcus tauri* phototropin. **New Phytologist**, v. 209, n. 2, p. 612–623, jan. 2016.

TAL, O. et al. Melatonin as an antioxidant and its semi-lunar rhythm in green macroalga *Ulva* sp. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 6, p. 1903–10, mar. 2011.

TESSMAR-RAIBLE, K.; RAIBLE, F.; ARBOLEDA, E. Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 33, n. 3, p. 165–72, mar. 2011.

TITLYANOV, E. A.; TITLYANOVA, T. V.; LÜNING, K. Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae. II. The green alga *Ulva pseudocurvata*. **European Journal of Phycology**, v. 31, n. 2, p. 181–188, 18 maio 1996.

TOMANEK, L.; HELMUTH, B. Physiological ecology of rocky intertidal organisms: a synergy of concepts. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 4, p. 771–5, 2002.

TROEIN, C. et al. Multiple light inputs to a simple clock circuit allow complex biological rhythms. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 66, n. 2, p. 375–85, abr. 2011.

TSUNOYAMA, Y. et al. Blue light-induced transcription of plastid-encoded psbD gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3304–3309, 2004.

VITALINI, M. W. et al. Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 46, p. 18223–8, 13 nov. 2007.

WANG, Z. Y. et al. A Myb-Related Transcription Factor Is Involved in the Phytochrome Regulation of an Arabidopsis Lhcb Gene. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 9, n. 4, p. 491–507, 1 abr. 1997.

WOELFLE, M. A. et al. The Adaptive Value of Circadian Clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. **Current Biology**, v. 14, n. 16, p. 1481–1486, 24 ago. 2004.

YEOM, M. et al. **How do phytochromes transmit the light quality information to the circadian clock in arabidopsis?** **Molecular Plant**, 2014.

YOUNG, M. W.; KAY, S. A. Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 9, p. 702–715, 2001.

ZHANG, X. et al. De novo sequencing and analysis of the *Ulva linza* transcriptome to discover putative mechanisms associated with its successful colonization of coastal ecosystems. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 565, jan. 2012.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Cicero Alves Lima Junior

Local e data de nascimento: São Luís, Maranhão. 18 de dezembro de 1986

EDUCAÇÃO

Escola Crescimento. São Luís, Maranhão. 24 de novembro de 2004

Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Maranhão. 18 de janeiro de 2010
Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo. 5 de dezembro de 2012
Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, processo 2013/05301-9, de 1/9/2013 a
31/12/2017

PUBLICAÇÕES

Marina Nasri Sissini, Maria Beatriz, Barbosa De Barros Barreto, Maria Teresa Menezes, Szé Chy, Marcos Bouças De Lucena, Mariana Cabral Oliveira, Jim Gower, Gang Liu, Eduardo De Oliveira Bastos, Daniela Milstein, Felipe Gusmão, Eduardo Martinelli-Filho, **Cícero Alves-Lima**, Pio Colepicolo, Gabriel Ameka, Kweku De Graft-Johnson, Lidiane Gouvea, Beatriz Torrano-Silva, Fabio Nauer, Marcos De Castro Nunes, José Bonomi Barufi, Leonardo Rörig, Rafael Riosmena-Rodriguez, Thayna Jeremias Mello, Leticia Veras, Costa Lotufo, Paulo Antunes Horta: **The floating *Sargassum* (Phaeophyceae) of the South Atlantic Ocean – likely scenarios**. Phycologia 03/2017;, DOI:10.2216/16-92.1

Cicero Alves-Lima, Natale Cavaçana, Gustavo Antonio Teixeira Chaves, Natalia Oliveira de Lima, Eliezer Stefanello, Pio Colepicolo, Carlos Takeshi Hotta: **Reference genes for transcript quantification in *Gracilaria tenuistipitata* under drought stress**. Journal of Applied Phycology 06/2016;, DOI:10.1007/s10811-016-0896-2