

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARIA VICTÓRIA MAGALHÃES DE VARGAS

**INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE *Funaria*
hygrometrica HEDW. (FUNARIACEAE) E NA EXPRESSÃO DO GENE
PHYPADRAFT_113035.**

**São Gabriel
2017**

MARIA VICTÓRIA MAGALHÃES DE VARGAS

**INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE *Funaria
hygrometrica* HEDW. (FUNARIACEAE) E NA EXPRESSÃO DO GENE
PHYPADRAFT_113035.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Filipe de Carvalho Victoria

Coorientadora: Ms. Mônica Munareto Minozzo

**São Gabriel
2017**

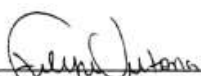
MARIA VICTÓRIA MAGALHÃES DE VARGAS

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE *Funaria hygrometrica* HEDW. (FUNARIACEAE) E NA EXPRESSÃO DO GENE PHYPADRAFT_113035.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 16 de novembro de 2017.

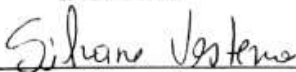
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Felipe de Carvalho Victoria
Orientador
UNIPAMPA



Dr.^a Margéli Pereira de Albuquerque
INCT-APA



Prof. Dr.^a Silvana Vestena
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e amor durante esta etapa, em especial aos meus pais Susele Magalhães e Luis Adriano de Vargas, por todo carinho e confiança em mim depositados. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos e me apresentarem a Ele, que sob proteção, me guiou em todos os caminhos desta graduação. Também às minhas irmãs, Anita Magalhães de Vargas e Bibiana Magalhães de Vargas, por cada momento de alegria dividido. Ser o exemplo de vocês é um privilégio. Sem vocês nada seria possível!

A meu orientador Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria pelos ensinamentos a mim confiados. Cada conselho possibilitou-me o desenvolvimento de uma ciência íntegra. Obrigada pela confiança em meu trabalho desenvolvidos nestes quatro anos. É uma grande oportunidade poder pesquisar ao lado do senhor.

À minha coorientadora Ms. Mônica Munareto Minozzo, por todo companheirismo na pesquisa, trabalhar ao seu lado vêm sendo uma honra. Obrigada por todo incentivo, pela coragem e gentileza. Fazer ciência baseando-se nesses princípios é uma lição que levarei para a vida. Gratidão por toda a amizade compartilhada comigo.

A todos meus professores que de alguma forma me fizeram amar ainda mais a biotecnologia. Obrigada por sempre demonstrarem que somos instrumentos para a melhoria de um ideal maior, que devemos respeitar a nossa matéria-prima, a natureza. Cada ensinamento dentro e fora da sala de aula servirá como base para o exercício da minha profissão.

Aos amigos, obrigada por cada momento compartilhado ao lado de vocês. Saibam que estes foram essenciais para a minha formação pessoal também.

À amiga e futura companheira de profissão, Thalita Fonseca de Araújo, obrigada por cada trabalho e instante dividido a teu lado. Poder compartilhar esta experiência contigo foi um privilégio. Sou grata pela tua compreensão em todos as experiências pela qual passamos. Sem a tua amizade esta graduação não seria a mesma, para sempre serás a minha dupla!

Ao amigo e companheiro de iniciação científica, Guilherme Afonso Kessler de Andrade, gratidão pela oportunidade de descobrir a ciência contigo. Cada aprendizado compartilhado me fez crescer como cientista e pessoa. Te admiro por sempre seguir teus ideais e saber ser forte em todos os momentos. Aprendo cada dia mais contigo. Obrigada por toda a amizade!

Aos meus amigos e colegas do NEVA – Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica, pesquisar ao lado de vocês e ter a oportunidade de aprender coisas novas todo dia, é engrandecedor. Às meninas do cultivo de plantas, gratidão por compartilhar com vocês o amor por esses organismos. Obrigada por todo o auxílio! Ao trio “IC’s A/B”, fazer ciência rodeada de amizade, torna esta atividade mais prazerosa. Muito obrigada por cada momento de descontração e apoio.

A cada pessoa que voluntaria ou involuntariamente, participou deste momento a meu lado, muito obrigada!

“...And you get a head
A head full of dreams
You can see the change you wanted
Be what you want to be...”

Coldplay

RESUMO

As plantas desenvolveram adaptações que respondem a várias condições de estresse geradas pelo ambiente, como o estresse por frio, seca, metais pesados e salinidade. Estas condições estressantes além de causarem grandes perdas na produção de biomassa vegetal, também resultam em ações de mecanismos de resposta a esses estresses, e podem ser detectados sob o ponto de vista molecular. Uma destas é o estresse salino, que pode causar estresse osmótico e estresse oxidativo para as plantas afetadas. Algumas plantas desenvolveram mecanismos de tolerância ao sal, estas são conhecidas como halófitas. *Funaria hygrometrica* Hedw. (Funariaceae) é um exemplo de espécie de musgo halófito, pertencente à mesma família do organismo modelo entre os bryophytes, o musgo *Physcomitrella patens* (Hedw.) Brunch & Schimp. *F. hygrometrica* produz abundantes esporófitos por população e um grande número de pequenos esporos que são facilmente dispersos pelo ar. Essa capacidade de dispersão faz de *F. hygrometrica* um importante modelo de estudo do estresse salino, uma vez que esses esporos podem ser dispersos em ambientes afetados por esse estresse abiótico, como ambientes marinhos, principalmente pela possibilidade de carreamento de diásporas pelas aves migratórias marinhas. A via fenilpropanoide (fenilpropanóide amônia lyase-PAL), neste trabalho representado pelo gene PHYPADRAFT_113035, uma cópia homóloga do gene da PAL, que participa da cascata de eventos moleculares que podem vir a gerar proteção aos estresses abióticos, justificando o estudo desse gene no estresse salino. O objetivo do presente trabalho foi identificar o desenvolvimento de *F. hygrometrica* e a expressão quantitativa do gene PHYPADRAFT_113035 nas espécies halófitas. Para os estudos de desenvolvimento e expressão quantitativa, os esporos de *F. hygrometrica* foram submetidos a diferentes tempos de imersão em solução salina, simulando a dispersão realizada por aves marinhas. Após a exposição dos esporófitos em solução salina, os esporos colocados em meio de cultura KNOP foram monitorados durante 30 dias e seu crescimento e sobrevivência foram analisados. A biomassa gerada foi submetida a extração de RNA para experiências de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Quando submetidas a diferentes tempos de imersão em solução salina, *F. hygrometrica* não mostrou diferenças significativas em seu crescimento. A expressão do gene foi aumentada no tempo de imersão inicial, 6 minutos, mas diminuiu nos tempos posteriores, esses resultados corroboram com a característica de retorno rápido da expressão da enzima PAL, conforme demonstrado por estudos anteriormente realizados. *F. hygrometrica* demonstrou-se uma espécie adequada para estudos de desenvolvimento e dispersão, pois suas adaptações auxiliam a sobrevivência deste organismo sob condições de estresse salino.

Palavras-chave: Musgos. Sal. Crescimento. Phenylpropanoid ammonia-lyase –PAL.

ABSTRACT

The plants developed adaptations to respond to various stress conditions generated by the environment, such as stress from cold, drought, salinity and heavy metals. These stressful conditions besides causing great losses in the production of vegetal biomass, also results in effects and actions of mechanisms of response to these stresses, which can be detected from the molecular point of view. One of these is salt stress, which can cause osmotic and oxidative stress to the affected plants. Some plants have developed salt tolerance mechanisms, these are known as halophytes. *Funaria hygrometrica* Hedw. (Funariaceae) is a species of halophyte moss, belonging to the same family of the model organism among the bryophytes, the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) Brunch & Schimp. *F. hygrometrica* produces abundant sporophytes per population and a large number of small spores that are easily dispersed through the air. This dispersion capacity makes *F. hygrometrica* an important model of saline stress study, since these spores can be dispersed in environments affected by this abiotic stress, such as marine environments, mainly by the possibility of carrying diaspores by marine migratory birds. The phenylpropanoid pathway (phenylpropanoid ammonia lyase-PAL), in this work represented by the gene PHYPADRAFT_113035, a homologous copy of the PAL gene, which participates in the cascade of molecular events that generate protection to the abiotic stresses, justifying the study of this gene in saline stress. The objective of the present work was to identify the development of *F. hygrometrica* and the quantitative expression of the PHYPADRAFT_113035 gene in the halophyte species. For the development and quantitative expression studies, *F. hygrometrica* spores were submitted to different immersion times in saline solution, simulating the dispersion carried out by seabirds. After an exposed spore were monitored for 30 days and their growth and survival were analyzed. The generated biomass was subjected to RNA extraction for quantitative real-time PCR experiments (qPCR). When submitted to different times of immersion in saline, *F. hygrometrica* did not show significant differences in its growth. The expression of the gene was increased in the initial immersion time, but decreased at the times achieved, these results corroborate with the rapid return characteristic of the PAL enzyme expression, as demonstrated by previous studies.

Keywords: Moss. Salt. Growth. Phenylpropanoid ammonia-lyase –PAL.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 HIPÓTESE	4
3 OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo Geral	5
3.2 Objetivos Específicos	5
4 GROWTH AND DEVELOPMENT OF HALOPHYTE <i>Funaria hygrometrica</i> HEDW. (FUNARIACEAE) UNDER SALT STRESS	6
5 INTRODUCTION	7
6 MATERIAL AND METHODS	8
6.1 Plants materials and growth conditions	8
6.2 Experimental design	8
6.3 Statistical analysis	8
7 RESULTS AND DISCUSSION	8
7.1 Regenerated spores	8
7.2 Diamenter of each protonemal growth	9
8 CONCLUSION	9
9 ACKNOWLEDGEMENTS	10
10 EXPRESSÃO QUANTITATIVA DO GENE PHYPADRAFT_113035 EM <i>Funaria hygrometrica</i> HEDW. (FUNARIACEAE) SOB AÇÃO DE ESTRESSE SALINO	12
11 MATERIAIS E MÉTODOS	13
11.1 Coleta do Material	13
11.2 Experimento de estresse salino	13
11.3 Extração de RNA	13
11.4 Conversão para cDNA	13
11.5 SYBR Green	13
11.6 qPCR	14
11.7 Avaliação de expressão diferencial relativa pelo método Delta Delta ct	14
12 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
13 CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
14 REFERÊNCIAS	20
15 ANEXOS	25

1 INTRODUÇÃO

As plantas desenvolveram adaptações para responderem à diversas condições de estresse no ambiente, ativando mudanças moleculares e fisiológicas específicas para minimizar danos, podendo sofrer diferentes estresses simultaneamente impactando na sua sobrevivência (MITTLER e BLUMWALD, 2010; SUZUKI et al., 2016). O estresse abiótico é um dos mais característicos e tem um enorme impacto no crescimento e, conseqüentemente, é responsável por grandes perdas. As reduções de crescimento resultantes a esse estresse podem atingir >50% na maioria das espécies de plantas (REJEB et al., 2014). Estresses abióticos como o estresse salino podem ocasionar diversos efeitos em plantas incluindo estresse osmótico, efeitos tóxicos quando há ação de altas concentrações de sal, e estresse oxidativo (FLOWERS, 2004; MUNNS e TESTER, 2008; SHABALA, 2013). Compreender os mecanismos com os quais as plantas percebem o sinal de sal e o transmitem para a maquinaria celular, gerando respostas adaptativas ativas, é de fundamental importância para a biotecnologia (WANG et al., 2008).

O estresse salino é uma das maiores causas de danos às culturas agrícolas em todo mundo. Pode causar toxicidade de Na^+ que afeta a absorção de K^+ e resulta no comprometimento de atividades enzimáticas, bem como a inibição de caminhos metabólicos (SUZUKI, 2016). Este transporte de íons via membranas celulares é um dos fatores básicos que determinam a tolerância à salinidade, concluindo que os fluxos de íons controlam as concentrações destes. Portanto a regulação dos fluxos são essenciais para a tolerância ao sal (VOLKOV, 2015). A resposta ao estresse salino em níveis celulares e moleculares, bem como na fisiologia e bioquímica, em plantas superiores, vem sendo estudados com intensidade (PARIDA e DAS, 2005). Porém, em briófitas este estresse ainda é pouco desenvolvido, contrapondo com a situação de que algumas briófitas desenvolveram respostas ao estresse durante a evolução tornando-se então halófitas, ou seja, capazes de desenvolverem-se em altas concentrações de sal, sob irrigação por água do mar e mesmo sob concentrações de sal várias vezes maiores do que na água do mar (VOLKOV, 2015).

O grupo de maior sucesso entre as plantas, excluindo as angiospermas, é a superdivisão Bryophyta. Estas destacam-se em números de espécies, diversidade de habitats e distribuição geográfica por serem encontradas em todos os continentes (TUBA et al., 2008). Essas conquistas de ambientes provêm de anos de evolução, onde as briófitas têm persistido por milhares de anos e são considerados parentes modernos mais próximos dos antepassados para as primeiras plantas terrestres (RENZAGLIA et al., 2007). Estas plantas são caracterizadas por um ciclo de vida com alternância de gerações, sendo a fase gametofítica dominante, produtora de gametas, e a fase diploide produz esporos haploides por meiose (VANDERPOORTEN e GOFFINET, 2009; COVE, 2005).

Elas diferem das plantas vasculares em diversos fatores, não possuem raízes, folhas e nem um sistema vascular. Devido a estes fatores, conseqüentemente podem estar delimitados a ambientes sombreados com alta umidade (SAXENA, 2004). O grupo Bryophyta é composto por antóceros, hepáticas e musgos. E este último localizado dentro do Filo Bryophyta. Este filo possui aproximadamente 13.000 espécies e é o segundo filo mais diverso entre as plantas terrestres. Seu corpo vegetativo pode ser dividido em rizóide, caulídeo e filídeos. Os rizóides ancoram a planta ao substrato e podem estar envolvidos na condução de água, são análogos às raízes mas diferem na sua arquitetura simplificada (GOFFINET et al., 2008). O caulídeo funciona como um eixo central para o gametófito (MALCOLM e MALCOLM, 2006), O transporte dentro da planta é realizado em parte por células de parênquima indiferenciadas do córtex, ou por células condutoras especializadas, as hidroidinas em algumas espécies de musgos (HÉBANT, 1977). A única característica unificadora dos filídeos dos musgos é que são sempre sésseis ao caulídeo, inseridos ao longo de toda a base (GOFFINET et al., 2008).

Entre as briófitas, o musgo *Physcomitrella patens* (Hedw.) Brunch & Schimp, pertencente à mesma família de *F. hygrometrica*, portanto semelhantes em termos evolutivos, tem sido utilizado como modelo experimental por cerca de 100 anos. Frequentemente associado a estudos evolucionais das

plantas, já que é um dos únicos modelos que encontra-se em uma posição basal na filogenia das plantas terrestres. Pertencente à família Funariaceae, que compreende aproximadamente 250-400 espécies de musgos entre 15 gêneros, *P. patens* possui uma variedade de fatores favoráveis ao seu uso como modelo experimental, na área de manipulação genética, seu curto período de geração, taxa rápida de crescimento, baixa estatura e complexidade morfológica, auxiliam a consolidação deste modelo entre as plantas (VAN GESSEL et al., 2017). Estes organismos podem ser utilizados em diversas áreas. Na Ecologia, os musgos podem ser descritos como bons indicadores de condições ambientais, como por exemplo indicadores de cálcio e outros nutrientes na água, e até mesmo indicadores de chuva ácida já que não possuem uma epiderme protetora, sendo então mais suscetíveis do que as plantas vasculares. Também são altamente disseminados na Horticultura, como aditivos de solo e cultivo para ornamentação. Os chineses e os nativos americanos utilizavam várias espécies de briófitas para uso medicinal, bem como os indianos. Os musgos eram empregados para o tratamento de muitas enfermidades, como problemas no sistema cardiovascular, queimaduras, bronquite, problemas renais, entre outros (SAXENA, 2004). Mais recentemente, foi relatado o potencial de *P. patens* como uma plataforma de vacinas baseadas em plantas, devido as suas características (MENDOZA et al., 2014).

Nessa perspectiva a cultura de tecido vegetal, é uma ferramenta importante, tanto básica como para estudos aplicados, bem como em aplicações comerciais. A cultura de tecidos vegetais é a cultura asséptica de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições *in vitro* físicas e químicas definidas. A base teórica para a cultura de tecidos vegetais foi proposta por Gottlieb Haberlandt em 1902 com o seu experimento sobre cultura de células isoladas (THORPE, 2007). Técnica importante para o conhecimento de diversas respostas das plantas à estresses, sob o cuidado do cultivo axênico.

Funaria hygrometrica Hedw. (Funariaceae), alvo do presente estudo pertence à classe Bryopsida, é uma briófito cosmopolita, monoica, halófito, comum, distribuída em diferentes habitats. Produz esporófitos abundantes por população e grande quantidade de pequenos esporos que são facilmente dispersos pelo ar (MAGDY et al., 2016). Essa habilidade de dispersão torna a *F. hygrometrica* um importante modelo de estudo sobre o estresse salino, visto que estes esporos podem vir a ser dispersos em ambientes afetados por este estresse abiótico.

Ubiquitin-proteasome system – UPS, possui a capacidade de controlar a degradação de várias proteínas nas células, afetando uma gama de processos celulares como a tradução de sinais, divisão celular, resposta imune e muitos outros. Muitas vezes a natureza molecular do sistema de degradação de algumas proteínas ainda não está clara, portanto a ubiquitina pode vir a exercer papel de referência em experimentos, como os que utilizam qPCR (ZHANG et al., 2013). Também é um dos responsáveis em coordenar o conteúdo proteico celular, incluindo enzimas essenciais como as quinases, fosfatases e hormônios envolvidos na sinalização e regulação de rotas celulares, como o ácido abscísico - ABA. Há um grande número de relatos na literatura onde o UPS está envolvido na regulação ao estresse de forma direta ou indireta. Como por exemplo, a ligase ubiquitina E3 que está envolvida no estresse à seca e ao sal através da sinalização do ABA (SHARMA et al., 2016).

Entre uma série de adaptações importantes que permitiram que as plantas terrestres sobrevivessem sob importantes estresses como, dissecação, radiação UV e ataque de patógenos microbianos, está o surgimento da via fenilpropanóide (phenylpropanoid ammonia-lyase –PAL). Estes compostos fenilpropanóides são precursores de uma ampla gama de compostos fenólicos com muitas funções em plantas sendo precursores dos flavonoides, isoflavonoides, cumarinas e estilbenos. Esses compostos possuem importantes funções sobre as defesas à estresses em plantas, como estresses abióticos (HUANG et al., 2010).

Aves podem dispersar unidades de plantas (diásporos) via ingestão ou externamente através do contato ao seu corpo (Lewis et al., 2014). Esporos de briófitas, como os de *F. hygrometrica*, que é uma espécie cosmopolita bipolar, podem ser transportados no corpo de várias aves migratórias marinhas e acabam sendo expostos à água do mar quando há o mergulho das aves, uma vez que as aves necessitam

alimentar-se. Esse tempo em contato com a água do mar pode causar diversas consequências às plantas, sendo de extrema importância o estudo da ação do sal em espécies halófitas, como o *F. hygrometrica*, e a quantificação da expressão de genes correspondentes a este estresse como a Ubiquitina e PAL.

2 HIPÓTESE

A espécie halófito *Funaria hygrometrica* Hedw. (Funariaceae) pode apresentar crescimento e expressão do gene PAL influenciado pelo estresse salino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar o desenvolvimento de *F. hygrometrica* e a expressão quantitativa do gene PHYPADRAFT_113035 nesta espécie halófito.

3.2 Objetivos Específicos

Estabelecer cultivo in vitro da espécie halófito *F. hygrometrica*;

Analisar a influência de diferentes tempos de imersão no sal sob o crescimento e desenvolvimento de *F. hygrometrica*;

Visualizar a expressão quantitativa de PAL, através de técnica de PCR Real-Time, em *F. hygrometrica* sob influência de diferentes tempos de imersão em solução salina.

4 ARTIGO 1

**GROWTH AND DEVELOPMENT OF HALOPHYTE *Funaria hygrometrica*
HEDW. (FUNARIACEAE) UNDER SALT STRESS**

(Publicado na revista Bioscience Journal, v.3, n.6, Nov./Dez. 17)

10 ARTIGO 2

EXPRESSÃO QUANTITATIVA DO GENE PHYPADRAFT_113035 EM *Funaria hygrometrica* HEDW. (FUNARIACEAE) SOB AÇÃO DE ESTRESSE SALINO

(Artigo a ser submetido na Revista Genetics and Molecular Biology)

11 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA), localizado na Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel.

11.1 COLETA DO MATERIAL

Os esporófitos de *F. hygrometrica* foram coletadas no campus São Gabriel da Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA, nas dependências da estufa número 2 da universidade (-30.3337015; -54.3625962).

11.2 EXPERIMENTO DE ESTRESSE SALINO

Visando a simulação do estresse salino na espécie halófita *F. hygrometrica*, os esporófitos foram coletados, e suas cápsulas esterilizadas durante três minutos em solução 70% de NaClO comercial (2,5%), seguindo protocolo adaptado de Cvetic et al., 2007. Após a desinfestação, as cápsulas foram tratadas com soluções salina em concentração de 550 mM, correspondente a água do mar (PANGUA et al., 2009), durante diferentes tempos de imersão: 0, 6, 12, 18 e 24 minutos, todas as exposições ao sal foram realizadas em réplicas biológicas de três. Após o estresse, os esporos foram colocados em vidros de cultivo *in vitro*, do tipo Bio-Sama com meio de cultura KNOP (RESKI e ABEL, 1985) que inclui, 250g.L⁻¹ de KH₂PO₄, KNO₃ e MgSO₄ x 7H₂O, 1g.L⁻¹ de Ca e 12,5mg.L⁻¹ de FeSO₄ x 7H₂O. O meio de cultura foi suplementado com 2,5g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldridge) e o pH ajustado para 5,8 com soluções de NaOH e HCl. Os vidros de cultivo foram colocadas em estufa de fotoperíodo a 25±1 °C com um fotoperíodo de 16/8h luz/escuro. Os esporos foram monitorados por 30 dias.

11.3 EXTRAÇÃO DE RNA

Após os 30 dias de cultivo, a biomassa vegetal gerada passou por extração de RNA, com o kit comercial de extração PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion), e o produto da extração quantificado no equipamento Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific).

11.4 CONVERSÃO PARA cDNA

O RNA extraído foi convertido para cDNA através do kit High-Capacity RNA to cDNA™ Kit, com um volume de reação de 20 µl.

11.5 SYBR Green

Para coloração e identificação da expressão quantitativa do gene PHYPADRAFT_113035 foi utilizado o kit Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

11.6 qPCR

Após a conversão de RNA para cDNA foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase –PCR, para seleção do primer (Tabela 1) que seria utilizado no experimento de qPCR (Figura 1). O melhor tamanho de amplicon para qPCR é sempre o menor. Os primers Phpat_002.1 e Phpat_002.2 chegam até no máximo 500pb, portanto foi escolhido o primer Phpat_002.2 já que este é correspondente a região homóloga de Pal-like. Seguida a escolha e coloração com SYBR Green, as amostras de cDNA foram submetidas ao experimento de qPCR em um termociclador para PCR Real-Time Rotor-Gene Q Series (Qiagen) para identificação da expressão de gene PHYPADRAFT_113035 alusivo ao estresse salino em *P. patens*.

11.7 Avaliação da expressão diferencial relativa pelo método Delta Delta ct

Para análise quantitativa dos níveis de expressão do gene PHYPADRAFT_113035, foi utilizado a avaliação da expressão relativa (Delta Delta ct) representada pela fórmula $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{gene de interesse}) - \Delta CT(\text{gene de referência}) = (CT_D - CT_B) - (CT_C - CT_A)$, sendo a Ubiquitina empregada como gene de referência, para o controle da expressão. O método de Delta Delta ct é uma forma para analisar as mudanças relativas encontradas na expressão gênica em experimentos de qPCR (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1: Primers utilizados para identificação do gene para realização do experimento de qPCR

Nome	Sequência 5' – 3'
Phpat_001.1_F	GAATCAGGAAGAGCTCCGGG
Phpat_001.1_R	ACAACAGCCATGTAGGCACG
Phpat_001.2_F	GTTGGTCAATGCATGCGCTC
Phpat_001.2_R	AGACGAACAACAGCCATGTAGG
Phpat_001.3_F	GCTGGCAAGTTAAATGAAGCGAA
Phpat_001.3_R	TTGTAGGAGCATGGTGATGGC
Phpat_002.1_F	AAGCTGTCGTCAACAACGGT
Phpat_002.1_R	CCGCGTTCAGAAACCTGATG
Phpat_002.2_F	TGTGAGTTCGATGGCGACAG
Phpat_002.2_R	CCC GCGTTCAGAAACCTGAT
Phpat_002.3_F	AAGCTGTCGTCAACAACGGT
Phpat_002.3_R	CCC GCGTTCAGAAACCTGAT

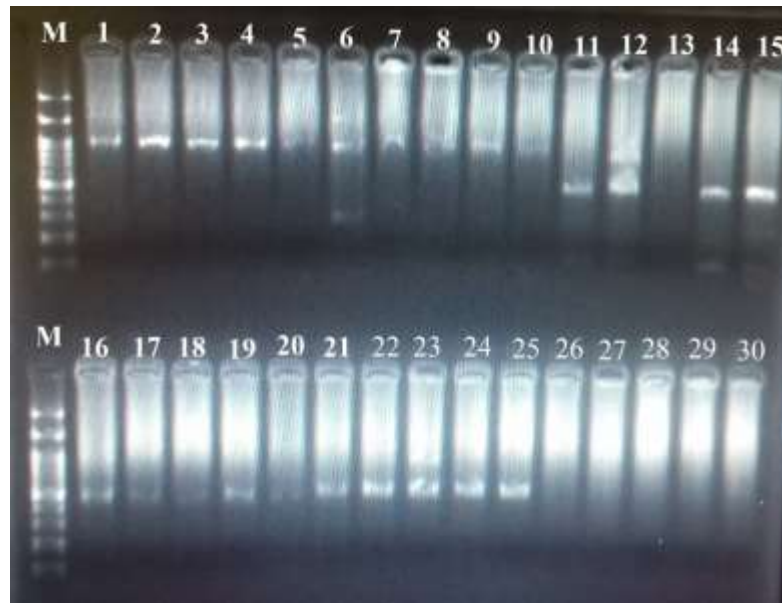


Figura 1: Gel de Agarose 3%. M= marcador 100pb; 1-5, primer Phpat_001.1, ordem de cDNA, controle, 6, 12, 18 e 24 minutos respectivamente; 6-10 primer Phpat_001.2, ordem de cDNA, controle, 6, 12, 18 e 24 minutos respectivamente; 11-15 primer Phpat_001.3, ordem de cDNA, controle, 6, 12, 18 e 24 minutos respectivamente; 16-20 primer Phpat_002.1, ordem de cDNA, controle, 6, 12, 18 e 24 minutos respectivamente; 21-25 primer Phpat_002.2, ordem de cDNA, controle, 6, 12, 18 e 24 minutos respectivamente e 26-30 primer Phpat_002.3, ordem de cDNA, controle, 6, 12, 18 e 24 minutos respectivamente.

12 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene PHYPADRAFT_113035 refere-se à proteína PAL em *P. patens*. Esta espécie, também pertencente à família Funariaceae, possui similaridade à *F. hygrometrica*, utilizada no presente estudo. Quando realizado alinhamento entre o gene PHYPADRAFT_113035 e *F. hygrometrica*, percebe-se a similaridade destas sequências (Anexo 1), sendo que as sequências de ambas espécies diferem apenas 30 nucleotídeos dos 1356 da região conservada para ambas as espécies, representando cerca de 2% de variabilidade entre as sequências. Este resultado demonstra uma alta similaridade entre uma mesma cópia entre espécies de gêneros distintos, uma vez que a literatura sugere similaridades entre cópias em espécies distintas de até 90% (FAWCETT E INNAN, 2016). Apesar do pouco que se conhece entre as relações filogenéticas das cópias de PAL em *P. patens* e *F. hygrometrica* (BAGAL et al., 2012), esta similaridade já era esperada (VAN GESSEL et al., 2017), uma vez que estas espécies encontram-se na mesma família e possuem os mesmos hábitos cosmopolitas (SCHUSTER 1983).

O experimento de qPCR (Figura 2) demonstrou o aumento da expressão do gene PHYPADRAFT_113035 nos tempos de imersão extremos – 6 e 24 minutos (Tabela 2).

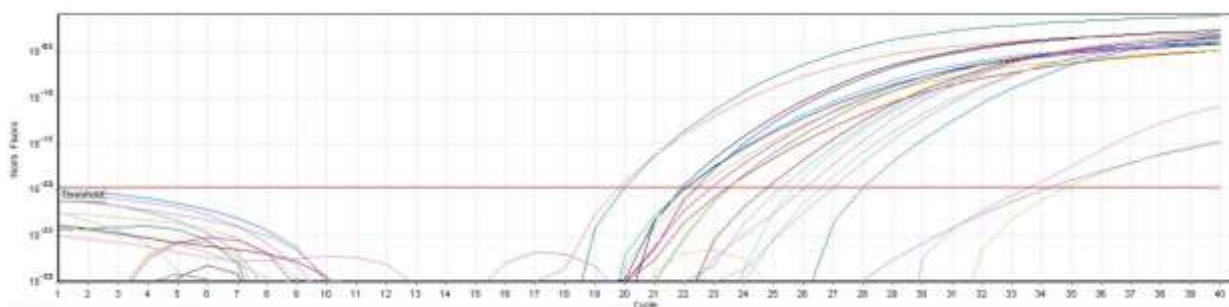


Figura 2: Resultado Experimento de qPCR, expressão do gene PHYPADRAFT_113035

Tabela 2: Níveis de expressão para cada tempo de imersão

Tempo de imersão (minutos)	Expression Fold Change
6	44,942236
12	2,41161566
18	0,18642493
24	3,53897933

Quando o gene PHYPADRAFT_113035 é comparado ao gene de referência (Ubiquitina) percebe-se o aumento de sua expressão no tratamento de 6 minutos, o menor tempo de imersão em solução salina (Figura 3), provavelmente pois nesse tempo os mecanismos de tolerância ao sal desenvolvidos pelas plantas halófitas, podem ainda não terem sido acionados.

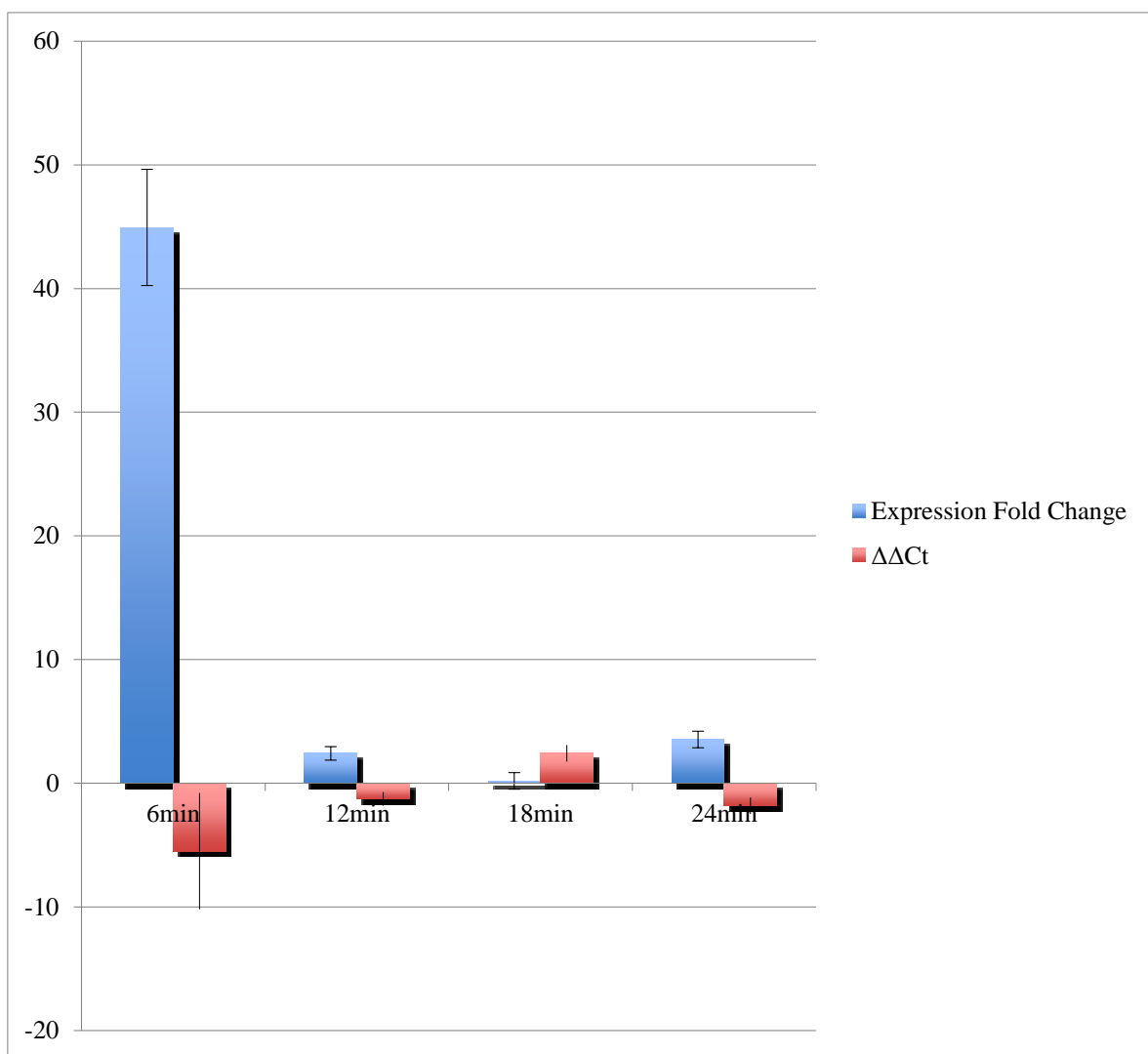


Figura 3: Análise de Delta Delta ct visando a visualização dos níveis de expressão do gene PHYPADRAFT_113035 em *F. hygrometrica* sob diferentes tempos de imersão em solução salina.

A biossíntese de fenilpropanóides converte L-fenilalanina (L-Phe) em compostos aromáticos diversos. Esta grande família de compostos aromáticos cumpre numerosas funções fisiológicas essenciais para o crescimento das plantas, desenvolvimento e interações planta-ambiente. Muitos compostos fenólicos solúveis, sintetizados de uma maneira específica da espécie, atuam como fitoalexinas anti-patogênicas, antioxidantes ou compostos absorventes de UV, protegendo as plantas dos estresses bióticos e abióticos, como o estresse salino (ZHANG, 2015).

Após 12 minutos de imersão no sal, os níveis de expressão são diminuídos corroborando com o que é encontrado na literatura. Estudos anteriores revelaram que os fatores ambientais aumentam transitoriamente o nível celular do PAL, após o aumento inicial, PAL geralmente diminui rapidamente para níveis basais ou quase basais sugerindo rotação rápida da enzima. Além disso, a alta concentração dos intermediários biossintéticos da via também provoca a regulação do feedback, desencadeando a rápida decadência da atividade do PAL (BUBNA et

al., 2011; JONES, 1984; LAMB et al., 1979; LAWTON et al., 1980; SHIELDS et al., 1982; TANAKA e URITANI, 1977; ZHANG et al., 2013).

Similar aos estudos realizados em *P. patens*, *F. hygrometrica* demonstrou resistência ao estresse salino, visto que, como uma espécie halófila, possui diversas adaptações a este estresse. Por apresentar uma formação de esporos abundantes por população, e normalmente encontrar-se em locais com presença de água, já que sua cápsula detém de adaptações para dispersão auxiliada pela umidade e vento, é esperado que a dispersão de seus esporos seja realizada também por aves marinhas (VAN GESSEL et al., 2017; MADGY et al., 2016). Portanto, estes esporos resistiriam à ação do sal em diferentes tempos de imersão na água do mar.

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a exposição de *F.hygrometrica* à solução salina, em diferentes tempos, não causa diferença significativa no seu desenvolvimento, possibilitando o crescimento desta espécie mesmo após a ação do sal. A expressão quantitativa do gene PHYPADRAFT_113035 é diminuída nos diferentes tempos de imersão ao sal, pois a resposta de PAL encontrada, geralmente é de uma rotação rápida. *F.hygrometrica* é uma planta halófito, com modificações metabólicas, morfológicas e anatômicas, o que provoca uma maior taxa de sobrevivência da planta para a imersão em sal, seja causada por diásporas de imersão, por meio de aves marinhas, ou até mesmo exposição ambiental. Possuintes destas características, *F. hygrometrica* demonstrou-se uma espécie adequada para estudos de desenvolvimento e dispersão, pois suas adaptações auxiliam a sobrevivência deste organismo.

14 REFERÊNCIAS

- BAGAL, U, R. et al. **The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific.** BMC genomics, v. 13, n. 3, p. S1, 2012.
- BATES, J. W. **Mineral nutrition, substratum ecology, and pollution.** In **Bryophyte Biology**, ed 2nd. J. Shaw & B. Goffinet. Cambridge: Cambridge University Press, p. 248-311, 2008.
- BATES, J. W.; WIBBELMANN, M. H.; PROCTOR, M. C. F. **Salinity responses of halophytic and non-halophytic bryophytes determined by chlorophyll fluorometry.** Journal of Briology, v. 31, p. 11-19, 2009.
- BENITO, B.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. **Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss Physcomitrella patens.** The Plant Journal, v. 36, n. 3, p. 382–389, 2003.
- BOGDANOVIĆ, M.; ILIĆ, M.; ŽIVKOVIĆ, S.; SABOVLJEVIĆ, A.; GRUBIŠIĆ, D.; SABOVLJEVIĆ, M. **Comparative Study on the effects of NaCl on selected moss and fern representatives.** Australian Journal of Botany, v. 59, n. 8, p. 734-740, 2012.
- BUBNA G.A., LIMA R.B., ZANARDO D.Y., DOS SANTOS W.D., FERRARESE Mde.L., FERRARESE-FILHO O. **Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (Glycine max).** J. Plant Physiol. 168: 1627–1633, 2011.
- CHOUKR-ALLAH, R.; MALCOLM, C. V.; HAMDY, A. **Halophytes and Biosaline agriculture.** Marcel Dekker, INC. 1996. 424 p.
- COVE, D. **The Moss Physcomitrella patens.** Annu. Rev. Genes, v. 39, p. 339-358, 2005.
- COVE, D.; BEZANILLA, M.; HARRIES, P.; QUATRANO, R. **Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development.** Annual Review of Plant Biology, v. 57, p. 497-520, 2006.
- CVETIC, T.; SABOVLJEVIC, A.; SABOVLJEVIC, M.; GRUBSIC, D. **Development of the moss Pogonatum urnigerum (Hedw.) P. Beauv. under in vitro culture conditions.** Archives of Biological Science, Belgrade, v. 59, n. 1, p. 57-61, 2007.
- FAWCETT, J, A.; INNAN, H. **High similarity between distantly related species of a plant SINE family is consistent with a scenario of vertical transmission without horizontal transfers.** Molecular biology and evolution, v. 33, n. 10, p. 2593-2604, 2016.
- FLOWERS, T. J. **Improving crop salt tolerance.** Journal of Experimental Botany, v. 55, n. 396, p. 307-319, 2004.

- FRANK, W.; RATNADEWI, D.; RESKI, R. **Physcomitrella patens is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress.** *Planta*, v. 220, n. 3, p. 384–394, 2005.
- FRITIOFF, A.; KAUTSKY, L.; GREGER, M. **Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants.** *Environmental Pollution*, v.133, n.2, p.265-274, 2005.
- GAO, S.; ZHENG, Z.; HUAN, L.; WANG, G. **G6PDH activity highlights the operation of the cyclic electron flow around PSI in Physcomitrella patens during salt stress.** *Scientific Reports*, v. 6, 2016.
- GOFFINET, B.; BUCK, W.R.; SHAW, A.J. **Bryophyte Biology.** Cambridge University Press, New York, p. 55-138, 2008.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. **Plant cellular and molecular responses to high salinity.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 51, p. 463–499, 2000.
- HÉBANT, C. **The Conducting tissues of bryophytes.** *Bryophytorum Bibliotheca*, v.10, p.1-157, 1977.
- HUANG, J et al. **Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress.** *Plant Physiology*, v. 153, n. 4, p. 1526-1538, 2010.
- JONES D.H. **Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction, and its role in plant development.** *Phytochemistry* 23: 1349–1359, 1984.
- LAMB C.J., MERRITT T.K., BUTT V.S. **Synthesis and removal of phenylalanine ammonia-lyase activity in illuminated discs of potato tuber parenchyme.** *Biochim. Biophys. Acta* 582: 196–212, 1979.
- LAWTON M.A., DIXON R.A., LAMB C.J. **Elicitor modulation of the turnover of L-phenylalanine ammonia-lyase in French bean cell suspension cultures.** *Biochim. Biophys. Acta* 633: 162–175, 1980
- LEWIS, L. R.; BEHLING, E.; GOUSSE, H.; QIAN, E.; ELPHICK, C. S; LAMARRE, J. F.; BÊTY, J.; LIEBEZEIT, J.; ROZZI, R.; GOFFINET, B. **First evidence of bryophyte diaspores in the plumage of transequatorial migrant birds.** *PeerJ*, v. 2, p. e424, 2014.
- LIVAK, K, J.; SCHMITTGEN, T, D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method.** *methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. **NaCl-induced senescence in leaves of rice (Oryza sativa L.) cultivars differing in salinity resistance.** *Annals of Botany*, v. 78, p. 389–398, 1996.

MAGDY, M. et al. **Genomic scanning using AFLP to detect loci under selection in the moss *Funaria hygrometrica* along a climate gradient in the Sierra Nevada Mountains, Spain.** *Plant Biology*, v. 18, n. 2, p. 280-288, 2016.

MALCOLM, B; MALCOLM, N. **Mosses and other Bryophytes, an Illustrated Glossary**, 2^a ed, Microoptics Press, New Zeland, 2006.

MENDOZA, S. R.; ESCOBEDO, L.O.; MALDONADO, A.R., DECKER, E.L.; RESKI, R. **The potential of *Physcomitrella patens* as a platform for the production of plant-based vaccines.** *Expert Reviews*, v.13, p.203-212, 2014.

MITTLER, Ron; BLUMWALD, Eduardo. **Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives.** *Annual review of plant biology*, v. 61, p. 443-462, 2010.

MUNNS, R.; TESTER, M. **Mechanisms of salinity tolerance.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 651-681, 2008.

PANGUA, E.; BELMONTE, R.; PAJARÓN, S. **Germination and reproductive biology in salty conditions of *Asplenium marinum* (Aspleniaceae), a European Coastal fern.** *Flora-Morphology Distribution Functional Ecology of Plants*, v. 204, p. 673-684, 2009.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. **Salt tolerance and salinity effects on plants: a review.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, p. 324-349, 2005.

REJEB, I, B; PASTOR, V; MAUCH-MANI, B. **Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms.** *Plants*, v. 3, n. 4, p. 458-475, 2014.

RENZAGLIA, K.S.; SCHUETTE, S.; DUFF, R.J. **Bryophyte phylogeny: advancing the molecular and morphological frontiers.** *Bryologist*, v. 110, p. 179-213, 2007.

RESKI, R.; ABEL, W. O. **Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine.** *Planta*, v.165, p. 354-358, 1985.
SAXENA, D.K. **Uses of bryophytes.** *Resonance*, v.9, p. 56-65, 2004.

SCHUSTER, R. M. **Phytogeography of the Bryophyta.** *New manual of bryology*, v. 1, p. 463-626, 1983.

SHABALA, S. **Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops.** *Annals of Botany*, v. 112, n. 7, p. 1209-1221, 2013.

SHARMA, B., JOSHI, D., YADAV, P. K., GUPTA, A. K., & BHATT, T. K. **Role of ubiquitin-mediated degradation system in plant biology.** *Frontiers in plant science*, v. 7., 2016.

SHIELDS S.E., WINGATE V.P., LAMB C.J. **Dual control of phenylalanine ammonia-lyase production and removal by its product cinnamic acid.** *Eur. J. Biochem.* 123: 389–395, 1982.

SUZUKI, Nobuhiro et al. **ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress.** PLoS One, v. 11, n. 1, p. e0147625, 2016.

TANAKA Y., URITANI I. **Synthesis and turnover of phenylalanine ammonia-lyase in root tissue of sweet potato injured by cutting.** Eur. J. Biochem. 73: 255–260, 1977.

THORPE, T. A.. **History of plant tissue culture.** Molecular biotechnology, 37(2), 169-180, 2007.

TUBA, Z.; SLACK, N.G.; STARK, L.R. **Bryophyte ecology and climate change.** Cambridge University Press, New York, 2011.

VAN GESSEL, N.; LANG, D.; RESKI, R. **Genetics and Genomics of Physcomitrella patens.** Plant Cell Biology, v.20, p.1-32, 2017.

VOLKOV, Vadim. **Salinity tolerance in plants. Quantitative approach to ion transport starting from halophytes and stepping to genetic and protein engineering for manipulating ion fluxes.** Frontiers in plant science, v. 6, 2015.

WANG, Xiaoqin; LIU, Zheng; HE, Yikun. **Responses and tolerance to salt stress in bryophytes.** Plant signaling & behavior, v. 3, n. 8, p. 516-518, 2008.

ZHANG, X., & Liu, C. J. **Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids.** Molecular plant, 8(1), 17-27, 2015.

ZHANG, X., Gou, M., & Liu, C. J. **Arabidopsis Kelch repeat F-box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase.** The Plant Cell, 25(12), 4994-5010, 2013.

15 ANEXOS

Alinhamento PHYPADRAFT_113035 e *F. hygrometrica*

Phylogeny.fr: ClustalW HTML Alignment

01/11/17 12:46

```
PHYPADRAFT      ATGGAAGCTGTCGTCAACAACGGTTGTGAGTTCGATGGCGACAGATCTCGCAAGATAAAG
Funaria_Hy      ATGGAAGCTGTCATCAACAACGGTTGTGAGTTCGATGGCGACAGATCTCGCAAGACAAAG
*****
PHYPADRAFT      ACAGTGGATGAGCCGTTCTGCATACTTGGAGCAGCTAATACTGTGGCGAAGATCGACGAC
Funaria_Hy      ACAGTGGATGAGCCGTTCTGCATACTTGGAGCAGCTACTGCTGTGGCGAAGATCGACGAC
*****
PHYPADRAFT      CCCCTGAACTGGGGCAAAGCTGCAGACGCATCGAAGATAAGTCACCTGGAGGAGGTAAAA
Funaria_Hy      CCCCTGAACTGGGGCAAAGCTGCAGACGCATTGAAGATAAGTCACCTGGAGGAGGTAAAA
*****
PHYPADRAFT      ACCCTTGTGAGAATCTTCTTTGAGGCGGATACGTTCGCCTGGAGGGTCAGAGCTTGACC
Funaria_Hy      ACCCTTGTCAAAATCTTCTTTGAGGCGGATACGTTCGCCTGGAGGGCCAGAGCTTGACC
*****
PHYPADRAFT      GTGGCCGATGTCGCGCGGATTGCTCGCCGACACGAGGTGCAAGTCCAGTTGGACTCCGCC
Funaria_Hy      GTGGCCGATGTCGCGCGGATTGCTCGCCGACACGAGGTGCAAGTCCAGTTGGACTCCGCC
*****
PHYPADRAFT      GTTGCGAAGGCTCGGGTGGACGAAAGCTCCGACTGGGTGCAGAAGAAGATCATGAAGGGA
Funaria_Hy      GTTGCGAAGGCTCGGGTGGACGAAAGCTCCGACTGGGTGCAGAAGAAGATCATGAAGGGA
*****
PHYPADRAFT      TCTGATATTTATGGTGTCAACCACCGCTTCGGAGCCACTTCCCATCGCCGCACCCAGCAA
Funaria_Hy      TCTGATATTTATGGTGTCAACCACCGCTTCGGAGCCACTTCCCATCGCCGCACCCAGCAA
*****
PHYPADRAFT      GGCCTGGAATTGCAGAGGGAACCTCATCAGTTTCTGAACGCGGGAGTAGTAAACTCTGGC
Funaria_Hy      GGCCTGGAACTGCAGAAGGAACCTCATCAGTTTCTGAACGCGGGAGTAGTAAACTCTGGC
*****
PHYPADRAFT      AACACTCTCCCGGTGAGTACAACCCGGGCTGCGATACTTGTTAGAACCAACACCCTTCTT
Funaria_Hy      AACACTCTCCCGGTGAGTACAACCCGGGCTGCGATACTTGTTAGAACCAACACCCTTCTG
*****
PHYPADRAFT      CAGGGTTACTCTGGTATCCGATGGGAAATCCTAGAAGCCATGCAGCAACTTCTGAACGCT
Funaria_Hy      CAGGGTTACTCTGGTATCCGATGGGAAATCCTAGAAGCCATGCAGCAACTTCTGAACGCT
*****
PHYPADRAFT      CGATTGACTCCAAAGCTTCCTTTGAGAGGAACCATAACAGCTTCCGGAGATCTCGTGCTT
Funaria_Hy      CGATTGACTCCAAAGCTTCCTTTGAGAGGAACCATAACAGCTTCCGGAGATCTCGTGCTT
*****
PHYPADRAFT      CTCTCGTATATCGCAGGACTCTTGACAGCGCGACCAAACCTCCGAGGCAGTAACCTGAGGAG
Funaria_Hy      CTCTCGTATATCGCAGGACTCTTGACAGCGCGACCAAACCTCCGAGGCAGTAACCTGAGGAG
*****
PHYPADRAFT      GGTAATCGATAACTGCAATGGAAGCCCTGAGGAAGATCGGCAGGGATCAACCATTTGAG
Funaria_Hy      GGTAATCGATAACTGCAATGGAAGCCCTGAGGAAGATCGGCAGGGATCAACCATTTGAG
*****
PHYPADRAFT      CTACAGCCCAAGGAAGGCTTGGCTATGGTGAATGGAAGTCTGTGGATCTGCATTGGCT
Funaria_Hy      CTACAGCCCAAGGAAGGCTTGGCTATGGTGAATGGAAGTCTGTGGATCTGCATTGGCT
**
PHYPADRAFT      TCCGTTTGTGCTTCGATGCAAACATCCTAGCAGTTCTGGCCGAAGTACTGGCTGCTCTC
Funaria_Hy      TCCGTTTGTGCTTCGATGCAAACATCCTAGCAGTTCTGGCCGAAGTACTGGCTGCTCTC
*****
```

http://www.phylogeny.fr/get_result.cgi?task_id=7ddaf3fb2941955ed99926e2033207e1&results_in_list=4&raw=1&file=alignment.html

Página 1 de 2

```

PHYPADRAFT      ATGGAAGCTGTCGTCAACAACGGTTGTGAGTTCGATGGCGACAGATCTCGCAAGATAAAG
Funaria_Hy      ATGGAAGCTGTCATCAACAACGGTTGTGAGTTCGATGGCGACAGATCTCGCAAGACAAAG
*****
PHYPADRAFT      ACAGTGGATGAGCCGTTCTGCATACTTGGAGCAGCTAATACTGTGGCGAAGATCGACGAC
Funaria_Hy      ACAGTGGATGAGCCGTTCTGCATACTTGGAGCAGCTACTGCTGTGGCGAAGATCGACGAC
*****
PHYPADRAFT      CCCCTGAACTGGGGCAAAGCTGCAGACGCATCGAAGATAAGTCACCTGGAGGAGGTAAAA
Funaria_Hy      CCCCTGAACTGGGGCAAAGCTGCAGACGCATTGAAGATAAGTCACCTGGAGGAGGTAAAA
*****
PHYPADRAFT      ACCCTTGTCAGAATCTTCTTTGAGGCGGATACTGTTCGCCTGGAGGGTCAGAGCTTGACC
Funaria_Hy      ACCCTTGTCAAAATCTTCTTTGAGGCGGATACTGTTCGCCTGGAGGGCCAGAGCTTGACC
*****
PHYPADRAFT      GTGGCCGATGTCGCAGCGATTGCTCGCCGACACGAGGTGCAAGTCCAGTTGGACTCCGCC
Funaria_Hy      GTGGCCGATGTCGCAGCGATTGCTCGCCGACACGAGGTGCAAGTCCAGTTGGACTCCGCC
*****
PHYPADRAFT      GTTGCGAAGGCTCGGGTGGACGAAAGCTCCGACTGGGTGCAGAAGAAGATCATGAAGGGA
Funaria_Hy      GTTGCGAAGGCTCGGGTGGACGAAAGCTCCGACTGGGTGCAGAAGAAGATCATGAAGGGA
*****
PHYPADRAFT      TCTGATATTTATGGTGTCAACCACCGGCTTCGGAGCCACTTCCCATCGCCGCACCCAGCAA
Funaria_Hy      TCTGATATTTATGGTGTCAACCACCGGCTTCGGAGCCACTTCCCATCGCCGCACCCAGCAA
*****
PHYPADRAFT      GGCGTGAATGTCAGAGGGAACATCAGGTTTCTGAACGCGGGAGTAGTAAACTCTGGC
Funaria_Hy      GGCGTGAATGTCAGAGGGAACATCAGGTTTCTGAACGCGGGAGTAGTAAACTCTGGC
*****
PHYPADRAFT      AACACTCTCCCGGTGAGTACAACCCGGGCTGCGATACTTGTTAGAACCAACACCCTTCTT
Funaria_Hy      AACACTCTCCCGGTGAGTACAACACGGGCTGCGATACTTGTTAGAACCAACACCCTTCTG
*****
PHYPADRAFT      CAGGGTACTCTGGTATCCGATGGGAAATCCTAGAAGCCATGCAGCAACTTCTGAACGCT
Funaria_Hy      CAGGGTACTCTGGTATCCGATGGGAAATCCTAGAAGCCATGCAGCAACTTCTGAACGCT
*****
PHYPADRAFT      CGATTGACTCCAAAGCTTCCCTTTGAGAGGAACCATAACAGCTTCCGGAGATCTCGTGCT
Funaria_Hy      CGATTGACTCCAAAGCTTCCCTTTGAGAGGAACCATAACAGCTTCCGGAGATCTCGTGCT
*****
PHYPADRAFT      CTCTCGTATATCGCAGGACTCTTGACAGCGCGACCAAACTCCGAGGCAGTAACTGAGGAG
Funaria_Hy      CTCTCGTATATCGCAGGACTCTTGACAGCGCGACCAAACTCCGAGGCAGTAACTGAGGAG
*****
PHYPADRAFT      GGTAATCGATAACTGCAATGGAAGCCCTGAGGAAGATCGGCAGGGATCAACCATTGAG
Funaria_Hy      GGTAATCGATAACTGCAATGGAAGCCCTGAGGAAGATCGGCAGGGATCAACCATTGAG
*****
PHYPADRAFT      CTACAGCCCAAGGAAGGCTTGGCTATGGTGAATGGAAGTCTGTTGGATCTGCATTGGCT
Funaria_Hy      CTACAGCCCAAGGAAGGCTTGGCTATGGTGAATGGAAGTCTGTTGGATCTGCATTGGCT
** *****
PHYPADRAFT      TCCGTTTGCTGCTTCGATGCAAACATCCTAGCAGTCTGGCCGAAGTACTGGCTGCTCTC
Funaria_Hy      TCCGTTTGCTGCTTCGATGCAAACATCCTAGCAGTCTGGCCGAAGTACTGGCTGCTCTC
*****

```