

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PABLO ECHEVERRIA MACEDO

**ANÁLISE TRANSCRIPTOMICA DE *Prasiola crista* (Lightfoot) Kützing REVELA
ESTRATÉGIAS DE RESISTÊNCIA AO AMBIENTE ANTÁRTICO**

**São Gabriel
2017**

PABLO ECHEVERRIA MACEDO

**ANÁLISE TRANSCRIPTOMICA DE *Prasiola crisper* (Lightfoot) Kützing REVELA
ESTRATÉGIAS DE RESISTÊNCIA AO AMBIENTE ANTÁRTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

Coorientador: Dr. Gabriel da Luz Wallau

**São Gabriel
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M141a Macedo, Pablo Echeverria
ANÁLISE TRANSCRIPTOMICA DE Prasiola crispa (Lightfoot) Kützing
REVELA ESTRATÉGIAS DE RESISTÊNCIA AO AMBIENTE ANTÁRTICO /
Pablo Echeverria Macedo.
62 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2017.
"Orientação: Paulo Marcos Pinto".

1. Prasiola crispa. 2. Transcriptoma. 3. Estresse Abiótico. I. Título.

Pablo Echeverria Macedo

PABLO ECHEVERRIA MACEDO

**ANÁLISE TRANSCRIPTOMICA DE *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing REVELA
ESTRATÉGIAS DE RESISTÊNCIA AO AMBIENTE ANTÁRTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Dissertação defendida e aprovada em: 02 de Março de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador
(Unipampa)

Prof^a. Dr^a. Margeli Pereira, de Albuquerque
(INCT-APA)

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
(Unipampa)

RESUMO

O continente Antártico se encontra aproximadamente centralizado no polo sul da Terra, sendo completamente isolado pelo encontro dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. A Antártica é o continente com as condições ambientais mais severas, onde estão presentes frio intenso, seca fisiológica, ventos severos e limitações de nutrientes. A composição da vida presente na Antártica é muito específica, com a presença de organismos incluindo procariotos e eucariotos, como fungos, protistas e algas. Entre as algas, *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing é o organismo mais comumente encontrado, representando um importante produtor primário. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos com o potencial adaptativo de *P. crispa* a esse ambiente são ainda desconhecidos. Sendo assim, para melhor compreender a capacidade de adaptação e desenvolvimento de *P. crispa* a estas condições, realizou-se através de sequenciador Illumina-Hiseq 2500, a obtenção do transcriptoma desse organismo. Posteriormente, baseando-se na utilização de softwares específicos, realizou-se a respectiva montagem e anotação dos dados advindos do sequenciamento. A montagem do transcriptoma de *P. crispa* resultou em 37.679 contigs, com um N50 de 1.389. O procedimento de anotação permitiu a identificação dos organismos com maior similaridade com *P. crispa*, onde destacou-se outra Chlorophyta pertencente ao ambiente antártico. Pode-se realizar a classificação dos transcritos em três diferentes categorias: processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares; assim como a visualização dos seus respectivos E-values. Por fim, pode-se realizar a identificação de 27 transcritos que possivelmente auxiliam *P. crispa* a se tornar apta a sobreviver no ambiente antártico. Sendo os mesmos distribuídos em características relacionadas à resistência e tolerância a baixas temperaturas, alta incidência de radiação ultravioleta, transporte de substâncias e altos níveis de salinidade.

Key words: *Prasiola crispa*, transcriptoma, sequenciamento de nova geração, anotação

ABSTRACT

The Antarctic continent is approximately centralized at the south of the Earth, being completely isolated in the meeting of the Atlantic, Pacific and Indic oceans. The Antarctic is a continent with the most severe conditions, where are present intense cold, physiological drought, severe winds and nutrient limitations. The composition of life present at Antarctic is very specific, with a presence of organisms including prokaryotes and eukaryotes, such as fungi, protists and algae. Among the algae, *Prasiola crispa* is an organism most commonly found, representing an important primary producer. However, the molecular mechanisms involved with the adaptive potential of *P. crispa* for this environment are still unknown. Therefore, to better understand the capacity of adaptation and development of *P. crispa* to these conditions, was made by Illumina-Hiseq 2500 sequencer, the achievement of the transcriptome this organism. Posteriorly, based on utilization of specific softwares, was made the respective assembly and annotation of the datas coming of sequencing. The assembly of the transcriptome of *P. crispa* resulted in 37,679 contigs, with an N50 of 1,389. The annotation procedure allowed the identification of the organisms with greater similarity with *P. crispa*, where stand out other Chlorophyta belonging to Antarctic environment. Can be performed the classification of the transcripts in three different categories, biological process, molecular functions and cellular components, as well as the view of their respective E-values. Lastly, can be performed the identification of 27 transcripts that possible help *P. crispa* to survive in the Antarctic environment. Being the same distributed in characteristics related to resistance and tolerance to low temperatures, high incidences of ultraviolet radiation, substances and nutrients transports and high salinity levels.

Palavras-Chave: *Prasiola crispa*, transcriptome, next generation sequencing, annotation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 As Algas	10
2.2 A Alga <i>Prasiola crista</i>	11
2.3 As características de sobrevivência ao ambiente Antártico.....	12
2.3.1 Temperatura.....	14
2.3.2 Salinidade.....	15
2.3.3 Radiação Ultravioleta	16
2.3.4 Nutrientes e Transportadores.....	18
2.3.5 Tolerância a Dessecação	18
2.4 Análise de Transcriptomas de Algas: Ferramentas e Resultados	19
2.4.1 Transcriptomas	20
2.4.2 Ferramentas computacionais: Montagem e anotação.....	22
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. Capítulo 1.	27
4.1 Metodologia.....	27
4.1.1 Blast2GO.....	27
4.2 Resultados e Discussão.....	27
4.2.1 Anotação do Transcriptoma: Blast e Gene Ontology (GO).....	27
4.2.2 Anotação do transcriptoma: Similaridade com outras espécies.....	29
4.2.3 Características de resistência ao ambiente Antártico.....	32
4.2.3.1 Radiação Ultravioleta	32
4.2.3.2 Transportadores	34
4.2.3.1 Estresse osmótico	37
4.2.3.1 Baixas temperaturas.....	40
5. Capítulo 2 - Manuscrito	42
6. CONCLUSÃO	51
7. PERSPECTIVAS	52
8. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A Antártica representa o continente com as condições ambientais mais severas, podendo ocorrer a presença de condições adversas como baixas temperaturas, altos índices de radiação ultravioleta, estresse salino, seca fisiológica, entre outros. Intimamente relacionado com as características adversas existentes nesse ambiente está a baixa diversidade de organismos encontrados. Estes, entre outros, limitam-se a organismos incluindo procariotos e eucariotos, como fungos, protistas e algas. Entre estas destaca-se *Prasiola crispa*, alga verde taloide com crescimento preferencial no ambiente Antártico sobre regiões supra litorâneas e próximas a colônias de aves, principalmente pinguins. *P. crispa* necessita apresentar estratégias específicas que possibilitem seu sucesso adaptativo sobre as diferentes condições ambientais em que pode ser exposta durante as diferentes estações no continente Antártico. As baixas temperaturas certamente representam a condição abiótica mais influente em relação a manutenção das funções metabólicas dos organismos, sendo que a presença de alto índice de insaturação da bicamada lipídica representa a estratégia mais comumente encontrada em diferentes organismos sobre essas condições. Outra condição abiótica com alta influência sobre diferentes organismos, principalmente os presentes no ambiente Antártico, é a grande incidência de radiação ultravioleta. Esta possui efeitos deletérios sobre ácidos nucléicos e proteínas, sendo a presença de alterações morfológicas nas estruturas celulares a principal estratégia para adaptação a essa condição. Análises moleculares a nível transcriptômico centradas nessas características representam uma estratégia com ótimo custo benefício para análise de organismos não modelo, cenário em que se encontra *P. crispa*. O emprego da transcriptômica para com o grupo das algas é centrado principalmente na elucidação de mecanismos relacionados com análises filogenéticas, produção de biocombustíveis e respostas de algas a estresses biótico e abiótico. O presente trabalho tem como foco se encaixar no âmbito relacionado com os mecanismos de resposta ao estresse abiótico, sendo assim, possui como objetivos sequenciar, montar e anotar o transcriptoma da alga antártica *P. crispa*, assim como a identificação dos transcritos relacionados com a manutenção e desenvolvimento de *P. crispa* ao ambiente Antártico, como a presença de baixas

temperaturas, alta incidência de radiação ultravioleta, transporte de nutrientes e diferenças osmóticas. Para isso, utiliza-se do emprego de ferramentas de bioinformática e de revisão bibliográfica para elucidação dos nuances envolvidos entre *P. crista*, seus transcritos e as condições abióticas presentes no continente Antártico. Para esse fim o trabalho é composto por uma revisão centrada nos termos gerais relacionados ao grupo das algas, assim como as características de resistência às condições abióticas encontradas no ambiente Antártico e as ferramentas computacionais empregadas para elucidação dos mesmos. Por fim, a identificação de transcritos relacionados com a adaptação de *P. crista* às condições extremas encontradas neste continente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2 As Algas

O termo Alga advém do latim *algae* (ervas marinhas). As algas são organismos pertencentes ao reino Plantae, caracterizadas como um diverso grupo de organismos fotossintéticos que não possuem estruturas como raízes, folhas e tecidos vasculares. Podem ser encontradas em ambientes marinhos e continentais, como oceanos, corpos de água doce, solos, rochas e árvores. A classificação do grupo das algas é baseada principalmente no tipo de pigmento e a respectiva coloração dos indivíduos, assim como características como substâncias de reserva e composição de estruturas celulares (VAN DEN HOECK, 1995).

Dentre os organismos conhecidos como algas, também são classificados indivíduos de diferentes reinos, como os organismos procariontes e unicelulares pertencentes ao reino Monera, conhecidos como Algas Azuis ou cianobactérias, onde essa coloração é baseada na presença de pigmentos como a ficocianina e a aloficocianina, assim como os organismos eucariontes e unicelulares pertencentes ao reino Protista, onde estão presentes diversos filos, como Dinophyta (dinoflagelados), Bacillariophyta (diatomáceas), Chrysophyta (crisófitas) e Euglenozoa (euglenófitas) (RAVEN et al., 2001; WHITTAKER; MARGULIS, 1978).

As algas pertencentes ao reino Plantae são divididas em três filos principais: Phaeophyta (algas pardas), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes) (HOECK et al., 1995).

As algas pardas pertencentes ao filo Phaeophyta abrangem cerca de 1.500 espécies descritas. São encontradas em zonas bentônicas, com grande incidência em ambientes marinhos e poucos exemplares encontrados em água doce. A coloração característica desse filo é baseada na presença do carotenoide fucoxantina, tendo como substância de reserva característica a laminarina (RAVEN et al., 2001).

As algas vermelhas pertencentes ao filo Rhodophyta abrangem cerca de 5.000 espécies descritas. São encontradas em todos os ambientes marinhos,

possuindo preferência sobre águas tropicais ao invés de águas frias. Assim como as algas pardas, a incidência de organismos em ambientes de água doce é menor quando em contraste com o ambiente marinho. A coloração característica desse filo é dada pela presença do carotenoide ficoeritrina, assim como a ficocianina e aloficocianina. A substância de reserva característica é o amido (RAVEN et al., 2007).

As algas verdes pertencentes ao filo Chlorophyta abrangem cerca de 17.000 espécies descritas. Diferentemente dos filios anteriores, possuem maior incidência sobre ambientes de água doce quando em contraste com os ambientes marinhos. Os organismos presentes em habitats terrestres são encontrados associados a troncos de árvores, solo e associações simbióticas com fungos (líquens). A coloração característica desse filo se dá pela presença do carotenoide clorofila, onde a substância de reserva característica é o amido armazenado em seus cloroplastos (RAVEN et al., 2007).

2.2 A alga *Prasiola crispa*

Sendo o filo Chlorophyta o mais numeroso dentre os filios constituintes das algas, apresentam uma gama de organismos amplamente diversificados morfológica e ecologicamente. Além das características como pigmentos e substâncias de reserva, características relacionadas a estruturas celulares, como a ultraestrutura do aparelho flagelar e a citocinese durante a mitose são utilizadas para a classificação dos organismos presentes nesse filo (MATTOX; STEWART, 1984). O filo Chlorophyta é subdividido em quatro classes: Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Ulvophyceae e Prasinophyceae (TURMEL et al., 1999).

A classe Trebouxiophyceae abrange algas presentes tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres (BOCK et al., 2011). As características citológicas capazes de diferenciar a classe Trebouxiophyceae das demais estão associadas à presença de células com um ou dois pares de flagelos, ausência de mastigonemas, corpos basais em sentido anti-horário, presença de quatro raízes microtubulares em arranjo cruciado, citocinese por ficoplasto, mitose fechada e reprodução assexuada (MATTOX; STEWART, 1984; LEWIS; MCCOURT, 2004; GUIRY; GUIRY, 2014). As características morfológicas variam desde algas com

talos unicelulares, coloniais, filamentosas ou com lâminas expandidas ou de pacotes (LELIAERT et al., 2012).

Dentre as diversas ordens constituintes da classe Trebouxiophyceae, Prasiolales compreende um dos grupos de algas verdes mais comumente encontrado em ambientes terrestres e de água doce em regiões polares (KOBAYASI, 1967; MONIZ et al., 2012; GARBARY; TARAKHOVSKAYA, 2013). A ordem é caracterizada tanto pela presença de filamentos unisseriados quanto talos em forma de fita, lâminas expandidas ou de pacotes como colônias (RINDI et al., 2007).

A família Prasiolaceae é caracterizada pela presença de um talo frondoso de folhas com forma variável, células dispostas em linhas verticais ou horizontais e a presença de um cloroplasto axial estrelado contendo um pineróide central (JOHN, 2002).

As espécies de algas polares classificadas na família Prasiolaceae pertencem principalmente ao gênero *Prasiola*. Dentre as mais de 20 espécies presentes no gênero, a mais comumente encontrada no bioma Antártico é *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing (Figura 1), que representa um importante produtor primário (WIENCKE; CLAYTON, 2002; CONVEY, 2007; KOVÁČIK; PEREIRA, 2001). *P. crispa* possui abundante crescimento nas zonas supralitorais antárticas, proeminentemente sobre solo úmido, declives pertencentes a comunidades de musgos, colônias de focas e frequentemente associado a habitats adjacentes a colônias de aves, principalmente colônias de pinguins, onde o solo presente é rico em guano, substrato com alta incidência de ácido úrico e compostos nitrogenados (GRAHAM et al, 2009; KOVÁČIK; PEREIRA, 2001).

Durante o decorrer das estações no território Antártico, *P. crispa* necessita tolerar condições ambientais extremas, como repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, seca fisiológica, limitação de nutrientes, estresse salino e altos níveis de radiação ultravioleta, sendo os genes associados a essas características desconhecidos (KOVÁČIK; PEREIRA, 2001; WIENCKE; CLAYTON, 2002; CONVEY, 2007).

FIGURA 1. *Prasiola crispera*.



Fonte: Graciele Alves.

2.3 As características de resistência ao ambiente antártico

A Antártica representa o continente com as condições ambientais mais severas, podendo ter sua extensão dividida em três áreas distintas, Sub-antártica, Antártica Marítima e Antártica Continental (CONVEY, 2007).

Intimamente relacionado com as características adversas existentes nesse ambiente está a baixa diversidade de organismos encontrados. Estes, entre outros, limitam-se a organismos incluindo procariotos e eucariotos, como fungos, protistas e algas (FELLER; GERDAY, 2003).

Os organismos adaptados a essas condições necessitam apresentar estratégias específicas para manutenção de suas funções fisiológicas sobre essas condições. Estas são baseadas principalmente na existência de mecanismos relacionados para com a resistência a baixas temperaturas, alterações nos níveis de salinidade, altos índices de radiação ultravioleta, deficiência nutricional e seca fisiológica (LOS; MURATA, 2004; SAHOO; SECKBACH, 2015; SEIDLITZ et al., 2001; JONES, 1991)

2.3.1 Temperatura

Dentre todos as adaptações existentes em organismos fotossintéticos presentes em regiões de baixa temperatura, como o ambiente Antártico, a permeabilidade da membrana é possivelmente a mais influente em relação a crescimento, manutenção do processo de fotossíntese e funções metabólicas (LOS; MURATA, 2004; MOCK; KROON, 2002; ROUTABOUL; FISCHER; BROWSE, 2000; THOMASHOW, 1998).

Características como a capacidade de regulação da composição dos ácidos graxos formadores da bicamada lipídica são de suma importância para este fim, onde destaca-se a capacidade de incorporação de ligações poli-insaturadas nas cadeias hidrocarbônicas, de cadeia curta, ramificações e ácidos graxos cíclicos. Dentre todas as estratégias citadas, a alta concentração de insaturação dos ácidos graxos, principalmente centrados na presença de ligações hidrocarbônicas do tipo poli-insaturadas, é certamente o fator crucial na manutenção da fluidez de membrana em baixas temperaturas, sendo essa característica encontrada em diversos organismos adaptados a ambientes com baixa temperatura, entre eles as algas verdes (WHITE; WYNN-WILLIAMS; RUSSELL, 2000; MORGAN-KISS et al., 2002).

Do ponto de vista molecular, o processo de biossíntese desses ácidos graxos e conseqüente mudança no grau de insaturação das membranas é regulado pela ação de diferentes classes de proteínas, como sintases, elongases, ligases, lipases e desaturases, além de condições abióticas, como altos índices de salinidade, dissecação, alta incidência de luminosidade e disponibilidade de nutrientes (NICHOLS et al, 2000; THOMPSON; HARRISON; WHYTE, 1990; REITAN; RAINUZZO; OLSEN, 1994; SHIFRIN; CHISHOLM, 1981). Além do elevado teor de lipídios, também podem estar relacionados com a tolerância de algas ao frio, a presença de proteínas de membrana conhecidas como lipocalinas, muito conhecidas em plantas terrestres e são associadas a tolerância ao frio e a dissecação (CHARRON et al., 2005), acúmulo de políeis e carboidratos (MARGESIN; SCHINNER, 1994; TEARLE, 1987; ROSER et al., 1992) e altas concentrações de dimetil sulfônio propionato (DMSP), supostamente importantes por funções crioprotetoras em algas verdes (KARSTEN et al., 1992).

Organismos presentes no ambiente antártico também estão constantemente expostos a ciclos de congelamento e descongelamento. Proteínas do tipo *Heat-Shock* possuem importante papel na manutenção das atividades biológicas em algas presentes nesses processos de aclimação, principalmente como auxílio no aumento da sobrevivência em fases iniciais de desenvolvimento de algas (LI; BRAWLEY, 2004).

Outros exemplos de adaptações as baixas temperaturas incluem a presença de proteínas de choque frio, proteínas anticongelantes e glicoproteínas anticongelantes, todas estas atuam se ligando a cristais de gelo em formação no interior dos organismos. Alguns organismos presentes no oceano polar não se valem de estratégias do tipo coligativas, como por exemplo a ação de açúcares ou sais, mas sim unicamente da presença dessas proteínas anticongelantes e glicoproteínas para amenizar o processo de crescimento do gelo (DAVIES; HEW, 1990).

2.3.2 Salinidade

Dentre as muitas condições abióticas que diferentes organismos podem estar expostos no ambiente antártico, existe a variância em níveis de salinidade (HOLZINGER; KARSTEN, 2013). Algas presentes em ambientes marinhos são expostas a níveis praticamente constantes de salinidade, apresentando curtos períodos de exposição a zonas costeiras em decorrência do movimento das ondas e marés, onde ocorre exposição a níveis de salinidade reduzida (ZHANG; GRADINGER; SPLINDER, 1999). Em contraste a isto, algas presentes em regiões mais centrais do continente antártico estão mais expostas à água da chuva, com menores índices de salinidade durante o decorrer das diferentes estações. Algas presentes em regiões supralitorais, como *P. crista*, estão, quando em comparação com as condições anteriores, mais expostas a borrifos de água do mar e condições de exposição a água da chuva, podendo ocorrer assim, maior variabilidade nos níveis de salinidade em que estão suscetíveis (SAHOO; SECKBACH, 2015).

Os organismos presentes em regiões supralitorneas necessitam apresentar tolerância a salinidades altas e baixas, assim como a consequente perda de água e perda iônica (SAHOO; SECKBACH, 2015). Dentre as características

necessárias para desenvolvimento sobre essas condições está a presença de altos níveis de ácidos graxos insaturados na constituição da membrana dos organismos presentes no ambiente antártico, sendo estes intimamente relacionados com vantagens adaptativas sobre condições de estresse salino (MORGAN-KISS et al, 2006). Além disso, diferentes classes de carboidratos de baixo peso molecular têm sido identificadas como importantes ferramentas para osmorregulação em diferentes grupos de algas (KIRST, 1990). Em algas verdes, a regulação osmótica está tipicamente associada a vários íons e vários solutos orgânicos que incluem prolinas, sucrose e DMSP (KARSTEN et al., 1991b, 1992).

Estudos realizados entre *P. crisper* e diferentes tipos de algas demonstraram que *P. crisper* possui maior tolerância ao estresse salino quando em comparação com outras algas verdes. Nestes, *P. crisper* pode resistir a uma faixa de tratamento de 0,35% até 175%. Em exposição a baixas salinidades, entre 0,35% e 35%, *P. crisper* apresentou ausência de vacúolos, sendo tanto crescimento quanto fotossíntese, inalterados. Já em exposição a salinidades maiores, >35‰, tanto crescimento quanto fotossíntese foram fortemente inibidos. Nestes experimentos, os níveis intracelulares de íons inorgânicos (Na^+ , K^+ , NH_4^+ Cl^- , PO_4^{3-}) foram inalterados pelo decréscimo nas condições hiposmóticas, entretanto, atingiram um máximo de 70% sobre essas condições. Em níveis hiperosmóticos extremos, os solutos orgânicos sacarose e sorbitol foram maiores (JACOB et al., 1991, 1992a, b).

2.3.3 Radiação Ultravioleta

Outro importante fator que pode causar danos em organismos encontrados no ambiente antártico, além do frio, é a radiação ultravioleta, que ocasionalmente pode ser potencializada pelo efeito de albedo (SEIDLITZ et al., 2001). Radiação ultravioleta pode ser classificada como UV-A, 380nm a 320nm, UV-B, 320nm a 290nm e UV-C, 290nm a 200nm.

Radiação ultra violeta UV-B, embora corresponda à menor porcentagem das radiações que chegam na terra, é altamente danosa por causa da capacidade de suas ondas, as quais possuem como característica causarem efeitos deletérios em células, assim como nos ácidos nucléicos, através da hidroxilação de

citossinas, formação de ligações entre citosinas e guaninas, criação de fotoprodutos entre bases adjacentes e desnaturação de fitas de DNA, além de limitação na síntese de proteínas, declínio na quantidade das mesmas, diminuição nas taxas de metabolismo de carbono e nitrogênio, como também influência deletéria em lipídeos e quinonas (JORDAN, 1996; VINCENT; ROY, 1993; DÖHLER, 1988, 1994). A alta incidência de radiação do tipo UV-B também pode influenciar o correto funcionamento do processo de fotossíntese, onde até mesmo a correta conformação e conseqüente fluidez da membrana lipídica pode também estar intimamente relacionada com a manutenção das funções fotossintéticas em regiões de baixas temperaturas (BISCHOF et al., 2002). Raios ultravioleta do tipo UV-B possuem a capacidade de penetração de até 6 cm na neve, e *P. crispa*, alga que cresce sobre solos úmidos e linha costeiras, é um grande candidato para ser afetado pelo mesmo (LÜTZ et al., 2005; KOVÁČIK; PEREIRA, 2001).

P. crispa é um dos organismos mais utilizados como modelo para estudos focados no impacto de radiação UV relacionado com crescimento, fisiologia e sobrevivência, onde pode-se evidenciar características como a produção de amino ácidos do tipo micosporina (MAAS) como resposta a um aumento de incidência de radiação Ultravioleta em *P. crispa*, o mesmo também ocorre para outros organismos. Além desta característica, estudos utilizando *P. crispa* demonstraram também que altos índices de radiação ultravioleta e de radiação fotossintética ativa (PAR) podem influenciar a eficiência dos processos ocorridos no fotossistema II e taxas de transporte de elétrons. Estes demonstraram que exposição em torno de 24 horas reduziram a eficiência do fotossistema II em cerca de 30% quando em comparação com o grupo controle (F_v/F_m), também ocorreu um declínio de cerca de 63% nos níveis de taxa de transporte de elétrons (rETR) em comparação com o grupo controle quando *P. crispa* era exposta a luz. Além destas, ocorreram alterações nos tilacóides, um aumento de 3 a 4 vezes, 0.4–0.8 μm de diâmetro, assim como ligeiras lesões a mitocôndrias.

Entre as características importantes para a tolerância a UV-B está a presença de carotenoides, podendo ser essenciais para a proteção de organismos fotossintetizantes, protegendo-os contra espécies reativas de oxigênio e conseqüente estresse oxidativo (KRINSKY, 1989).

2.3.4 Nutrientes e transportadores

Algas e plantas necessitam do aporte nutricional para a sua correta manutenção e desenvolvimento. Estes são de suma importância para funções como crescimento, metabolismo e reprodução (PEDERSEN; BORUM, 1996).

No ambiente antártico, várias são as possíveis fontes de nutrientes, principalmente relacionadas com a presença de neve, como, precipitação pluviométrica, intemperismo, deposição de partículas como areia, pólen, detritos orgânicos e animais (JONES, 1991).

Nutrientes como carbono, fósforo e nitrogênio são essenciais para o desenvolvimento das algas. O carbono é requerido principalmente para o crescimento das algas e é proveniente das formas de dióxido de carbono (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}). O fósforo é requerido principalmente para processos fotossintéticos e de respiração celular, sendo proveniente na forma de fosfato (HPO_4^{2-}). A amônia (NH_4^+), nitrito (NO_2^+) e nitrato (NO_3^-) são uma das fontes de nitrogênio mais comumente encontradas no ambiente antártico, sendo o mesmo essencial para o crescimento para a manutenção dos processos celulares, como fotossíntese, produção de células e tecidos, de proteínas, entre outros (SAHOO; SECKBACH, 2015).

O processo de obtenção dos nutrientes é altamente influenciável por condições como temperatura, exposição a luz solar, dessecação e a respectiva forma como os mesmos se encontram disponibilizados. Atrelado a essas condições, a presença de transportadores e permeases para os diferentes tipos de nutrientes representam um papel fundamental, servindo como mecanismo de entrada para nutrientes específicos e como linha de defesa para os mesmos quando necessário (BLABY-HAAS; MERCHANT, 2012).

2.3.5 Tolerância a dessecação

Outro fator correlacionado com a sobrevivência de diferentes organismos no ambiente Antártico é a tolerância para com altos índices de dessecação. Estes, em alguns casos são baseados em modificações especializadas associadas a parede celular e a matriz celular, todas com o intuito de evitar a o processo de dessecação. Entretanto, aparentemente, a resistência à dessecação é baseada

principalmente no desenvolvimento de mecanismos baseados em tolerância a essa condição. Embora estudos relacionados com as características de tolerância a dessecação sejam apenas baseados na relação superfície/volume de diferentes organismos, pode-se constatar, em algumas espécies a presença de adaptações que retardam a dessecação e favorecem uma reidratação mais rápida, como visto por exemplo, em *P. crispera*. Estudos baseados neste organismo, demonstraram que *P. crispera* apresenta um menor nível de perda de água que outras algas em condições similares de umidade, onde, essa capacidade de resistência se deve provavelmente a presença de materiais lipofílicos na superfície de talos e pela presença de compostos pécticos (pectina) na parede celular da mesma. (JACOB et al., 1992b).

Em *P. crispera* também foi constatado que os processos fisiológicos envolvidos tanto nas estratégias de resistência a dessecação quanto as de resistência à alta salinidade, embora aparentemente próximos, diferem. No aspecto metabólico, *P. crispera* demonstrou alterações no metabolismo de fosfato durante condições de exposição a meios osmóticos não iônicos, ocorrendo aumento no fosfato inorgânico presente no citoplasma e uma diminuição nas concentrações de polifosfatos. Ambas as condições foram seguidas de um aumento no fosfato inorgânico presente no meio extracelular, sendo após o período de quatro horas de retorno ao meio convencional, a obtenção do reestabelecimento das funções fotossintéticas (BOCK et al., 1996). Em períodos anteriores, houveram ensaios demonstrando processos intimamente relacionados entre altos índices de exposição a dessecação com o consequente rompimento de membrana celular e alterações em processos fotossintéticos (SMITH et al., 1986; LIPKIN et al., 1993).

2.4 Análise de transcriptomas de algas: ferramentas e resultados

Em meados da década de 70, metodologias baseadas na obtenção de sequências de nucleotídeos, independente do seu tamanho, representavam um grande desafio. No decorrer do ano de 1977, entretanto, com o surgimento de novas tecnologias relacionadas com processos de hidrólise química e reações enzimáticas, desenvolveu-se a primeira metodologia relacionada à determinação de uma sequência de nucleotídeos com tamanhos maiores. Sendo assim, como consequência, implementou-se o primeiro método de sequenciamento

automático, tecnologia batizada como método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

No ano de 2001, após a publicação do projeto genoma humano (VENTER et al., 2001; LANDER et al., 2001), houve um grande interesse no desenvolvimento e aperfeiçoamento nas tecnologias de sequenciamento de DNA, processo que culminou no surgimento dos sequenciadores de nova geração. Os mesmos suprem as limitações que eram encontradas no método de Sanger, como por exemplo o tempo e a capacidade de geração de dados e um aumento significativo nos dados gerados (MARDIS, 2008; CULLUM; ALDER; HOODLESS, 2011).

As técnicas de sequenciamento massivo de nucleotídeos de nova geração, ou sequenciamento em larga escala, tiveram início no ano de 2005. Intrínseco a essa tecnologia, está a obtenção do sequenciamento de moléculas de DNA em plataformas capazes da geração de informações sobre milhões de pares de base em uma única corrida. Entre as diferentes técnicas desenvolvidas e amplamente empregadas, ocorrem variações centradas tanto na precisão da detecção de bases nitrogenadas, no volume de dados gerados e principalmente no mecanismo químico empregado (MACLEAN et al., 2009).

Atualmente, as tecnologias de sequenciamento de nova geração podem ser divididas em dois grupos baseados em características metodológicas. O primeiro grupo abrange as tecnologias baseadas em PCR, sendo constituído pelas plataformas 454 FLX (Roche), Solexa (Illumina), SOLiD System, Ion Torrent (Life Technologies), e o segundo grupo abrange as tecnologias baseadas em sequenciamento de molécula única, sendo constituído pelas plataformas Helicos HeliScope, Pacific Biosciences system (Helicos).

Sendo assim, dentre as diferentes aplicações relacionadas a estas plataformas, está o sequenciamento de transcriptomas através de bibliotecas de cDNAs, ou RNA-seq.

2.4.1 Transcriptomas

Inicialmente, na década de 1990, as técnicas empregadas com o objetivo de determinação de padrões de expressão gênica eram baseadas basicamente em Northern blot, microarrays, os cDNA-AFLP e análise serial de expressão de

genes SAGE (*serial analysis of gene expression*), entretanto, riscos como hibridação cruzada, intervalo dinâmico limitado e principalmente a necessidade do conhecimento prévio do genoma a ser estudado, tornavam o emprego dessas técnicas limitante, fatores que levaram a necessidade do desenvolvimento de alternativas eficientes para a solução desses problemas (WARD et al., 2012).

Dentre as metodologias atuais de análise de transcritos de um tecido ou organismos, destaca-se a construção de bibliotecas de cDNAs e o sequenciamento parcial de clones de cDNAs escolhidos aleatoriamente para a geração das Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs). Essas construções são úteis pois representam os genes que são expressos na forma de RNA mensageiro (mRNAs) em determinadas células ou tecidos em um determinado período, o que permite, entre outros, comparar a expressão gênica diferencial (YING, 2004).

Resumidamente, as bibliotecas de cDNAs são construídas usando moléculas de mRNAs presentes em amostras como molde. Essas moléculas sofrem a ação da enzima transcriptase reversa, obtendo-se então os cDNAs. Essas moléculas de cDNAs são então inseridas em vetores, normalmente plasmídeos e introduzidas em organismos receptores suscetíveis, normalmente bactérias, conformando assim, as bibliotecas. Posteriormente os plasmídeos recombinantes são extraídos das bactérias e são sequenciados utilizando *primers* específicos para porções presentes no vetor e que flanqueiam o inserto. O procedimento de sequenciamento se dá através das peculiaridades de cada sequenciador existente no mercado, gerando em média de 30 a 400 pares de base, que serão posteriormente montados com o objetivo da obtenção dos transcritos relacionados com a expressão de diferentes genes (WANG et al., 2009)

Sendo assim, aliando o sequenciamento massivo de cDNA gerado graças ao advento das plataformas de sequenciamento de nova geração (do inglês *next generation sequencing* NGS), desenvolveu-se a tecnologia do RNA-seq como uma das ferramentas mais importantes de análise de transcriptomas.

O transcriptoma pode ser definido como o conjunto total de transcritos de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular tanto em um estágio específico de desenvolvimento quanto em uma dada condição fisiológica. Sendo assim, incluem, portanto, RNAs codificantes (mRNAs) e não codificantes (rRNAs, tRNAs, RNAs estruturais, RNAs regulatórios, dentre outros). O perfil de um

transcriptoma pode variar conforme diversos fatores como, estímulos físicos, químicos e biológicos, alimentação, ciclo celular, patologias, estado fisiológico, entre outros (WANG et al., 2009). Análises transcriptômicas apresentam vantagens interessantes quando em comparação com outras metodologias de análise, como:

1. Os insertos de DNA, podem constituir cópias da extensão total do RNAm dos quais derivam.
2. Os cDNAs obtidos dos mRNAs são amplos o bastante para reunirem os representantes de todas as sequências de interesse, inclusive as menos raras
3. Podem não possuir íntrons, ou apenas alguns deles, o que permite a determinação direta das sequências de nucleotídeos e tradução para sequências de aminoácidos.
4. Quantidades menores de RNA necessárias para realização da técnica.

2.4.2 Ferramentas computacionais: Montagem e anotação

O amplo desenvolvimento dos métodos e tecnologias ligadas ao sequenciamento massivo de moléculas de DNA, geraram um grande acúmulo de informações moleculares relacionadas tanto ao próprio DNA, quanto a moléculas de RNA e proteínas.

Uma limitação encontrada na maioria das tecnologias atuais de sequenciamento está relacionada com o pequeno tamanho dos fragmentos gerados durante o procedimento de síntese das sequências de interesse. Em condições ideais o sequenciamento resultaria na obtenção em tamanho real de todos os transcritos encontrados no interior celular, entretanto, após o processo de sequenciamento, procedimentos relacionados a montagem se fazem necessários. O procedimento de montagem de sequências de DNA advindas de sequenciamento (*reads*) é baseado na sua sobreposição, sendo a redundância encontrada entre as mesmas adotada como parâmetro para a reconstituição de um segmento maior (*contig*). Este procedimento tem como intuito a reconstituição de maneira fidedigna de todos os transcritos recorrentes no meio celular.

As metodologias destinadas a montagem tanto para genomas quanto para transcriptomas, podem ser separadas em duas categorias: a primeira categoria abrange a montagem por referência, ou seja, aquela em que os fragmentos

advindos do sequenciamento são alinhados contra um genoma ou transcriptoma previamente reconhecido e assim, adotado como referência; a segunda categoria abrange a montagem *De novo* (do latim, desde o princípio), ou seja, aquela em que não há disponibilidade de um genoma ou transcriptoma previamente reconhecido para ser adotado como referência (MILLER et al., 2010).

A montagem de transcriptomas geralmente representa uma ótima saída para o desenvolvimento molecular relacionado com o estudo de espécies de organismos não modelo, tanto de interesse econômico quanto biológico, onde normalmente não há informações previamente estabelecidas a organismos correlatos. No que concerne aos procedimentos metodológicos de montagem, portanto, o procedimento *De novo* se mostra o mais indicado a ser conduzido (RIESGO, 2012).

O procedimento metodológico *De novo* de montagem é constituído em geral, por duas abordagens principais: a primeira abordagem conhecida como *overlap-layout-consensus* (OLC), ou grafo de sobreposições, é dividida em três etapas. A primeira etapa consiste na realização de todas as sobreposições possíveis com as *reads* existentes (*overlap*); a segunda etapa, consiste na verificação de todos os arranjos que contemplem o maior número de *reads* e sobreposições (*layout*); e a terceira ocorre o cálculo de consenso entre as mesmas, resultando assim, na reconstrução das sequências (*consensus*). Nessa abordagem, as *reads* são adotadas como nós dos grafos e as sobreposições, como arestas (POP, 2009; SCHATZ et al., 2010; MILLER et al., 2010; CONWAY; BROMAGE, 2011), sendo o caminho Hamiltoniano, ou seja, aquele em que ocorre a passagem por todos os nós de grafos, de uma única vez, adotado como princípio para a realização do procedimento de *layout* e a frequência de um nucleotídeo em determinada posição, adotada como princípio para determinação da base consenso (PASZKIEWICZ; STUDHOLME 2010). A segunda abordagem, conhecida como *bruijn graphs*, ou grafos de bruijn (COMPEAU; PEVZNER; TESLER, 2011), consiste na quebra das *reads* advindas de sequenciamento em fragmentos menores, denominados como K-mers. Nessa abordagem, K é o tamanho estabelecido para a quebra das *reads*, onde uma sequência tida como $N > K$, resulta através de $(N - K + 1)$, no número de subsequências de tamanho K (K-mers) presentes nas *reads* iniciais. Baseando-se então nos K-mers obtidos, mapeia-se as sobreposições de comprimento K-1 entre os mesmos. Nessa abordagem, os

K-mers são adotados como nós dos grafos e as sobreposições de K-1, como arestas. Sendo assim, adota-se o caminho euleriano, ou seja, aquele em que ocorre a passagem por todas as arestas de um grafo como princípio para realização do procedimento de recomposição do transcrito original.

O procedimento de anotação funcional consiste na agregação de informações biológicas às sequências advindas dos procedimentos de montagem. Para isso, ocorre a comparação entre as sequências a serem anotadas com as sequências presentes em bancos de dados com funções biológicas previamente reconhecidas (STEIN, 2001). Sendo assim, pode-se identificar através de similaridade a função de um determinado transcrito em um determinado organismo. Como os transcriptomas representam apenas as frações expressas dos genomas, permitem a análise genética sem a presença de regiões intergênicas, alguns íntrons e DNA repetitivo (RIESGO, 2012).

Dentre as diversas tecnologias atuais destinadas à realização do procedimento de anotação funcional de sequências, destaca-se a ferramenta Blast2GO (CONESA et al., 2005). A metodologia utilizada por esta ferramenta é baseada na submissão das sequências montadas ao algoritmo Blast (ALTSCHUL et al., 1990), onde posteriormente ocorre a vinculação dos resultados obtidos com as informações presentes em um banco de dados baseado em termos de ontologia, conhecido como *Gene Ontology* (GO) (ASHBURNER et al., 2000). O GO é fruto da realização de um consórcio com o fim de padronizar genes e produtos em uma subdivisão em três categorias: processos biológicos, ou seja, atividade biológica com o qual o gene ou seu produto está envolvido; função molecular, ou seja, a atividade bioquímica em que um gene ou produto está envolvida; e componente celular, ou seja, local na célula onde um gene ou produto é ativo.

Os resultados de anotação podem ainda ser enriquecidos por diferentes ferramentas presentes no software Blast2GO, como a submissão dos dados à ferramenta InterProScan (QUEVILLON et al., 2005), com o objetivo de identificação de assinaturas proteicas: GO-Slim, com o objetivo de identificação de subconjuntos de termos presentes no banco de dados GO intimamente relacionado a grupos de organismos de interesse: KEGG (KANEHISA;GOTO, 2000), com o objetivo da obtenção de mapas metabólicos em que os genes e seus produtos estão envolvidos, entre outros.

A utilização de abordagens transcriptômicas para resolução de nuances envolvidos com algas é bem estabelecido. Atualmente, o número de transcriptomas de algas existentes em bancos de dados como o MMETSP (Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project, Keeling, 2014), se encontra em 18. Outro banco de dados, o 1KP (One Thousand Plants Consortium, Matasci et al., 2014), se encontra em 239.

O emprego dessas abordagens é centralizado principalmente em questões como os mecanismos de adaptação das algas a condições de estresse biótico e abiótico (Hwang, 2008), resolução de problemas relacionados com evolução e análises filogenéticas (Wickett, 2014) e identificação de genes relacionados com a produção de biocombustíveis (Yazdi, 2011).

Baseando-se nisso, o presente trabalho realizou o emprego de abordagens transcriptômicas e de anotação funcional com o intuito de melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos com o processo de adaptação de *P. crispata* ao ambiente antártico, como características de resistência ao frio, aos altos índices de radiação ultravioleta, as flutuações de salinidade e ao transporte de nutrientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sequenciar, montar e anotar o transcriptoma da alga antártica *Prasiola crispera*.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter a sequência completa do transcriptoma de *P. crispera*.
- Montagem e anotação funcional do transcriptoma de *P. crispera*.
- Identificação dos transcritos relacionados com a manutenção e desenvolvimento de *P. crispera* ao ambiente antártico, como: baixas temperaturas, alta incidência de radiação ultravioleta, transporte nutricional e diferenças osmóticas.

4. CAPÍTULO 1

Neste capítulo serão apresentados os dados referentes a anotação funcional do transcriptoma de *P. crispa*.

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Blast2GO

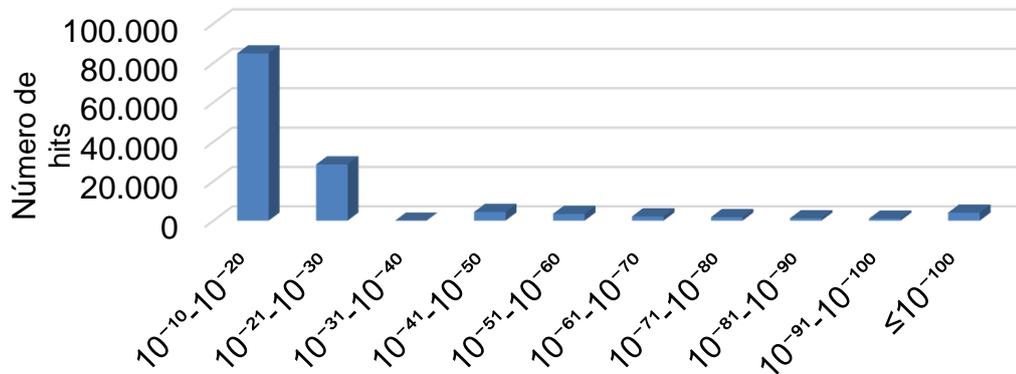
Para determinação da anotação funcional de *P. crispa* e consequente determinação de similaridade de espécies resultantes da análise, utilizou-se o software Blast2GO, versão 4.0.7 (CONESA et al, 2005). Para isso, utilizou-se o algoritmo blastx para o banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI (nr). Sendo assim, um e-value máximo de 10^{-10} foi adotado como critério para realização do processo de anotação. Posteriormente, para o procedimento de anotação baseado na terminologia Gene Ontology relacionado com as categorias de processos biológicos, processos moleculares e componentes celulares, utilizou-se o software Blast2GO com um e-value máximo de 10^{-10} .

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Anotação do Transcriptoma: Blast e Gene Ontology (GO)

Baseando-se no transcriptoma montado, constituído de 37.579 sequências, obteve-se a anotação utilizando-se o banco de dados nr como referência. 60% dos resultados advindos do algoritmo blastx realizados com o banco de dados nr, resultaram em E-values de cerca de 10^{-10} - 10^{-20} enquanto que apenas 10% resultaram de E-values de alta afinidade, menores do que 10^{-50} (Figura 2).

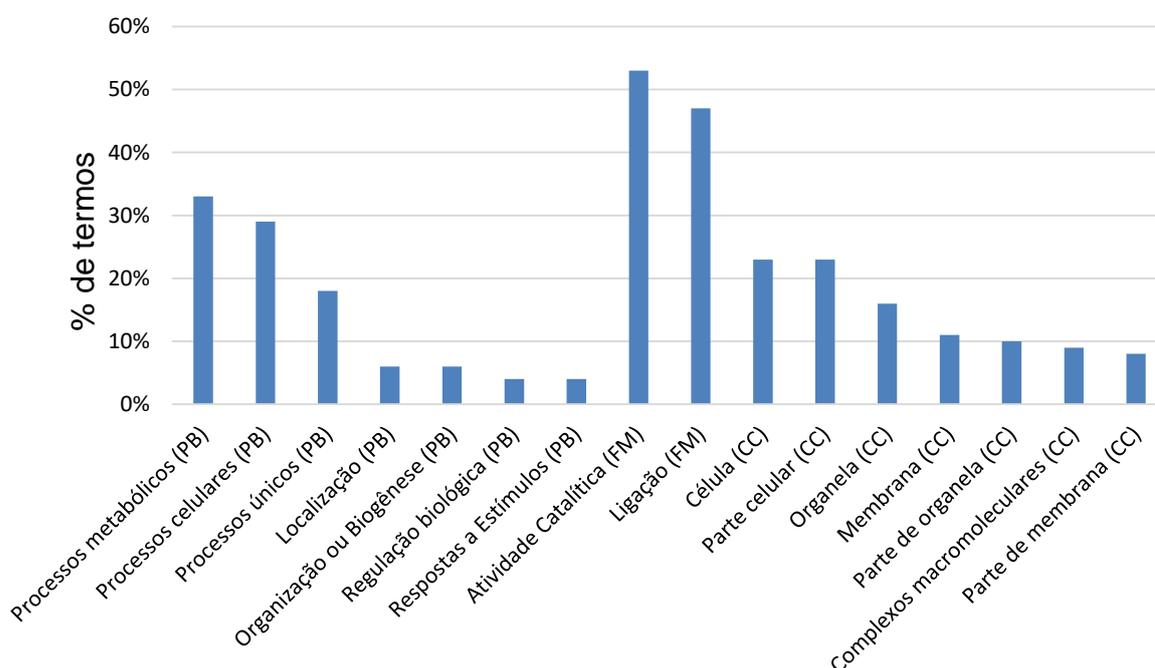
Figura 2 – Distribuição dos E-values. Frequência de distribuição dos E-values advindos do algoritmo blastx utilizando o banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI como referência.



Fonte: do autor

Baseando-se nos dados advindos do procedimento de anotação pela terminologia presente no banco de dados Gene Ontology, obteve-se a distribuição dos termos GO, onde a distribuição relativa destes termos em divisão de nível 2 pode ser visualizada na Figura 3. Pode-se observar uma considerável representatividade de sequências associadas a processos biológicos (PB), sendo estas representadas por processos metabólicos (GO:0008152), celulares (GO:0009987), únicos (GO:0044699), entre outras. Na subdivisão funções moleculares (FM), pode-se observar grande representatividade de sequências associadas com atividades catalíticas (GO:0003824) e ligação (GO:0005488). Altas porcentagens de representatividade de sequências associadas a componentes celulares foram constatadas, principalmente pela presença das categorias célula (GO:0005623), parte celular (GO:0044464) e organela (GO:0043226). Essas informações podem refletir as estratégias utilizadas por *P. crispus* para o processo de aclimatação e sobrevivência no ambiente antártico. O alto índice de transcritos relacionados com processos metabólicos e celulares é comumente observado em diferentes organismos (LENZ et al.,2014), entretanto, a presença das categorias relacionadas a respostas a estímulos e regulação biológica, onde estão presentes transcritos envolvidos com respostas a estímulos abióticos, como baixas temperaturas e dano por radiação ultravioleta, condições encontradas por organismos no ambiente antártico, podem servir como justificativa para essa afirmação.

Figura 3 – Distribuição baseada em GO. Distribuição da anotação baseada em GO para gene ontology em divisão de nível 2 para processos biológicos (PB), Função Molecular (FM) e componente celular (CC). PB: Processos metabólicos (GO:0008152), Processos celulares (GO:0009987), Processos únicos (GO:0044699), Localização (GO:0051179), Organização ou biogênese (GO:0071840), Regulação biológica (GO:0065007), Resposta a estímulos. FM: Atividade catalítica (GO:0003824), Ligação (GO:0005488). CC: Célula (GO:0005623), Parte celular (GO:0044464), Organela (GO:0043226), Membrana (GO:0016020), Parte de organela (GO:0044422), Complexos macromoleculares (GO:0032991), Parte de membrana (GO:0044425).



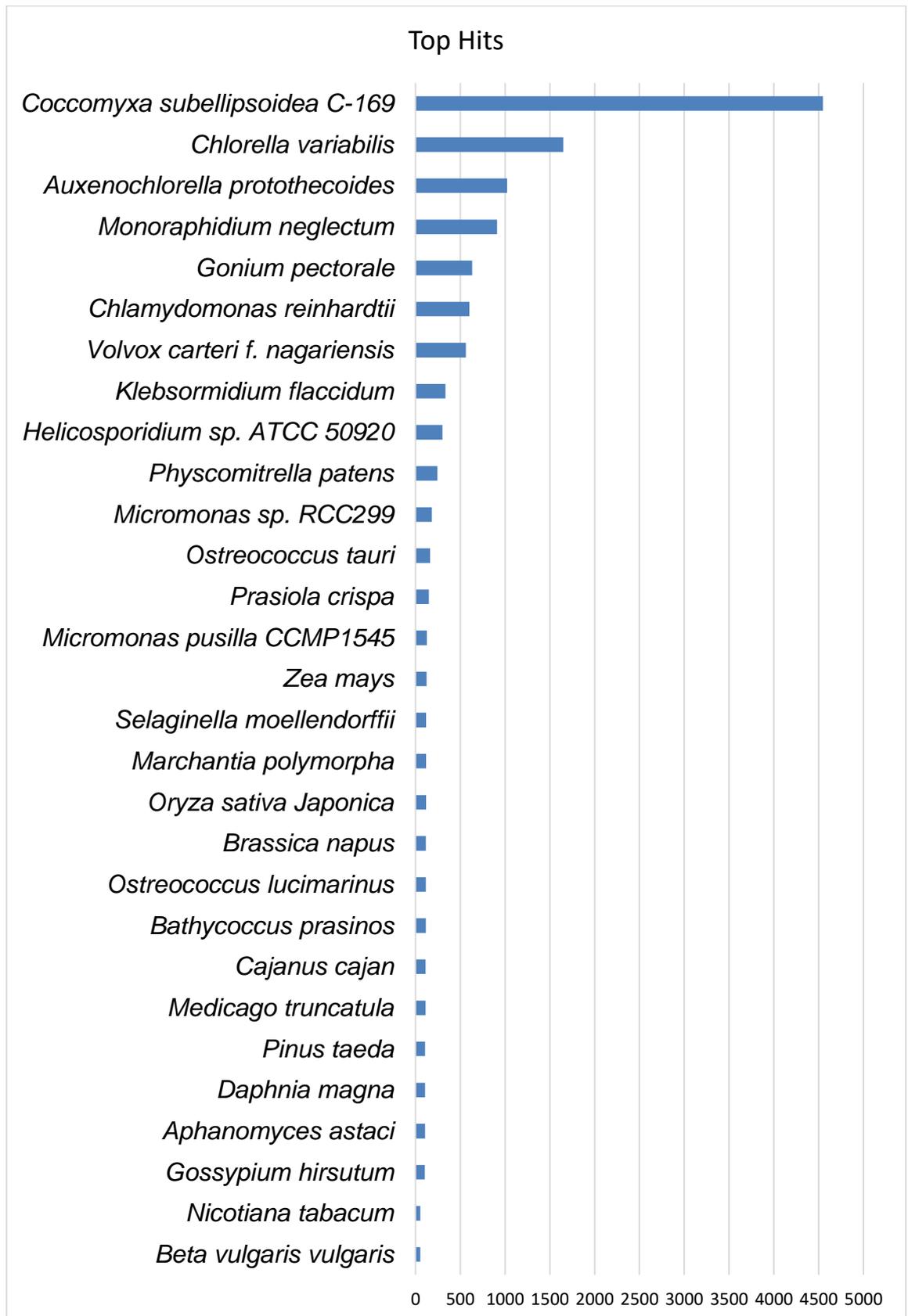
Fonte: do autor

4.2.2 Anotação do Transcriptoma: Similaridade com outras espécies

Análises baseadas nos resultados advindos do algoritmo blast, possibilitaram a identificação das espécies classificadas como top-hits, ou seja, aquelas com um maior grau de similaridade de sequência com *P. crista* (Figura 4), nessas, 29 espécies apresentaram mais do que 100 hits encontrados. *Coccomyxa subellipsoidea* E.Acton foi a espécie com maior número de top-hits, (4.549), assim como, *Chorella variabilis* I.Shihira & R.W.Krauss, *Auxenochlorella protothecoides* (Krüger) Kalina & Puncochárová, *Monoraphidium neglectum* Heynig & Krienitz, *Gonium pectoral* O.F.Müller e *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard, todas com mais de 600 hits (1.650, 1.024, 910, 633 e 602,

respectivamente). *C. subellipsoidea*, espécie de alga verde unicelular pertencente ao filo Chlorophyta, primeiro organismo pertencente ao ambiente polar a ter seu genoma sequenciado (BLANC et al, 2012). *C. variabilis* é uma espécie de alga verde unicelular pertencente ao filo Chlorophyta sendo um organismo modelo para estudos relacionados com interações entre vírus e algas (BLANC et al, 2010). *A. protothecoides*, é uma espécie de alga verde unicelular pertencente ao filo Chlorophyta, é um organismo com grande potencial relacionado com a produção de biodiesel, sendo proposto como um dos melhores candidatos entre as algas para esse fim (MIAO; WU, 2006). Juntas, essas algas são as representantes com um maior número de top-hits relacionados com o transcriptoma de *P. crista*. (>1.000). A similaridade encontrada entre *P. crista* com estas algas, principalmente com *C. subellipsoidea*, sugere que estes organismos possuam algum compartilhamento de informações genéticas, principalmente levando em consideração os fatores abióticos encontrados no meio de sobrevivência de ambas.

Figura 4 – Relação de similaridade entre espécies. Espécies com maior similaridade a nível molecular com *P. crispa*.



Fonte: do autor

4.2.3 Características de resistência ao ambiente Antártico

Adaptações para tolerância ao ambiente antártico são baseadas principalmente na fluidez da membrana plasmática dos organismos. Atreladas a essa condição, pode-se constatar vários diferentes tipos de condições abióticas possivelmente danosas em que *P. crisper* se utiliza dessa estratégia para seu sucesso adaptativo.

Entre as condições abióticas, baseando-se na literatura, pode-se citar altos níveis de salinidade, altos índices de radiação ultravioleta, flutuações nos níveis de salinidade e de temperatura, entre outros.

Entretanto, diferentes estratégias podem estar relacionadas com a capacidade de adaptação de *P. crisper* a essas condições. Sendo assim, valendo-se da anotação funcional do transcriptoma de *P. crisper*, pode-se especular transcritos putativamente envolvidos com essas características.

4.2.3.1 Radiação Ultravioleta

Embora a resistência a altos índices de radiação ultravioleta seja principalmente devido à modificação na morfologia das estruturas celulares, assim como a presença de altos índices de carotenoides, pode-se identificar transcritos relacionados aos processos moleculares de reparo a danos causados pela exposição excessiva a radiação, principalmente do tipo UV-B.

Sendo assim, baseando-se nos resultados advindos do algoritmo blast e termos GO, pode-se identificar transcritos envolvidas com a resposta a radiação Ultravioleta (GO:0009411 – Tabela 1).

Tabela 1 – Transcritos putativamente relacionados com resistência a radiação ultravioleta.

Proteína	Organismo	E-value
Proteína de ligação ao DNA danificado 2	<i>Populus euphratica</i>	7.41e ⁻¹⁹
Fator de replicação Replicação C (RFC)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.37 ⁻²⁵

Culin-4Alike	<i>Cyphomyrex costatus</i>	9.22e ⁻²⁴
Fator de replicação Replicação C (RFC)-4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4.78e ⁻²¹
Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)	<i>Zea mays</i>	3.98e ⁻¹²
Ubiquitina F-box/WD 7 (FBW7)	<i>Monoraphidium neglectum</i>	6.09e ⁻¹⁵
Helicase de reparo ao DNA UVH6	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	3.84e ⁻²⁶

Dentre as sequências identificadas, ressalta-se a presença de muitos transcritos putativamente codificando proteínas relacionadas com danos causados ao DNA, como proteína de ligação ao DNA danificado 2 (DDB2), fator de replicação C (RFC), cullin-4, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteína de reparo e excisão de DNA (ERCC-2) e helicase de reparo de DNA UVH6. A presença desses transcritos pode confirmar a existência do mecanismo de rota de reparo e excisão de nucleotídeos (NER) em *P. crisper*. NER é o principal mecanismo para neutralização de mutações químicas e efeitos mutagênicos causados pela radiação ultravioleta (HOEIJMAKERS, J.H, 2001; GILLET, L.C; SHARER, O.D, 2006).

Ademais, foram identificados transcritos putativamente codificando a proteína ubiquitina F-box/WD 7 (FBW7), proteína relacionada com a mediação de formação de proteossomas e degradação. (POPOV et al, 2007), demonstraram que a proteína FBW7 possui ação sobre complexos relacionados com proliferação celular, crescimento e apoptose, sendo esta em resposta a fatores externos, como diferentes índices de radiação ultravioleta. Nestes casos, o controle para essas condições se dá através da degradação proteossômica acarretada pela ligação de FBW7 a esses complexos. Em *P. crisper*, a presença desses transcritos pode sugerir a existência de mecanismos similares de regulação em resposta tanto a radiação ultravioleta como também para com outras condições danosas.

4.2.3.2 Transportadores

A capacidade de sobrevivência de *P. crista* no ambiente antártico também está atrelada a capacidade de obtenção de nutrientes. Como *P. crista* é encontrada, principalmente em zonas de colônias de aves, como por exemplo, comunidades de pinguins, estas são possivelmente a sua principal fonte de nutrientes.

Sendo assim, baseando-se nos resultados advindos do algoritmo blast e termos GO (GO:0006810 – Tabela 2), pode-se identificar transcritos envolvidas com a capacidade de transporte desses nutrientes.

Tabela 2 – Transcritos putativamente relacionados com o transporte de substâncias.

Proteína	Organismo	E-value
Transportador ABC - C	<i>Pomoea nil</i>	4.62e ⁻²³
Transportador ABC - G	<i>Noccaea caerulescens</i>	2.24e ⁻¹⁸
Transportador ABC - B	<i>Gossypium raimondii</i>	6.83e ⁻¹⁷
Transportador AMT: amônia	<i>Boea hygrometrica</i>	3.12e ⁻⁴⁸
Transportador com alta afinidade com nitrato 2.5	<i>Nicotiana attenuata</i>	1.6e ⁻¹⁵
Transportador de metal Nramp5	<i>Morus notabilis</i>	3.36e ⁻⁶⁰
Transportador Geral de Substratos (MFS-GST)	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	1.33e ⁻²⁰
Transportador de níquel	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1.2e ⁻⁰⁹
Transportador P-ATPase: cálcio	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	9.57e ⁻¹⁹
Transportador de zinco	<i>Triticum urartu</i>	6.05e ⁻¹²
Resistência ao alumínio	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	4.61e ⁻²⁰

Fonte: do autor.

Dentre os transcritos anotados ressalta-se a presença daqueles putativamente codificando transportadores de membrana com alta afinidade com Nitrato. As proteínas identificadas foram classificadas como carregadores constitutivos de alta afinidade (Inducible High Affinity Transport System – IHATS), estes são fortemente induzidos pela presença externa de NO_3^- disponível, possuindo grande capacidade de absorção quando em comparação com outros tipos de carregadores de N (FORDE, 2000; SIDDIQI; GLASS; RUTH, 1991). O nitrato representa a fonte mais importante de N para as plantas que possuem crescimento aeróbico, onde, neste processo o NO_3^- proveniente do solo é absorvido e reduzido a amônio (NH_4^+) pela ação da enzima nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) (Lea et al., 1990). *P. crisper* possui crescimento preferencialmente sobre substratos ricos em ácido úrico e compostos nitrogenados, como a amônia, podendo crescer duas vezes melhor do que em outros substratos (GRAHAM et al, 2009; Kováčik; PEREIRA, 2001). *P. crisper* também possui transcritos putativamente codificando proteínas transportadoras de amônio/amônia pertencentes a família AMT. Baseando-se nos genomas conhecidos de Chlorophytas, a família AMT é amplamente representada, sendo outras famílias de transportadores de amônio/amônia, como MEP e Rh pouco encontradas (MCDONALD; WARD, 2016).

Foram identificados também transcritos putativamente codificando transportadores ABC, os mesmos estão presentes em um grande número de organismos (HENIKOFF et al., 1997), estando em plantas e algas envolvidos com processos de detoxicação, resposta à patogenicidade, deposição de lipídios, transporte de fitorreguladores, como auxina e ácido abscísico, desenvolvimento e nutrição, e envolvimento com a resposta celular a interações e estresse abiótico (KANG et al., 2011). *P. crisper* apresentou transcritos putativamente codificando transportadores ABC das subfamílias ABCG, ABCC e ABCB, ambos sendo mais encontrados em plantas terrestres do que em diferentes tipos de algas (LANE et al., 2016), A subfamília ABCC está relacionada com o papel de detoxicação e regulação de estômatos (KLEIN; BURLA; MARTINOIA, 2006), a subfamília ABCG com o transporte de lipídios (PIGHIN et al., 2004) e a ABCB, com a adaptação a ambientes com a presença de metais pesados, como alumínio, cádmio e chumbo, isso graças a sua capacidade de transporte de substâncias xenobióticas (KIM et al., 2006; CHEN et al., 2007).

É sugerido que *C. subellipsoidea*, alga com maior similaridade com os transcritos de *P. crisper*, organismo encontrado sobre rochas no ambiente antártico, também possui adaptações relacionadas com as encontradas em plantas terrestres para tolerância a metais pesados, especificamente o alumínio (BLANC et al., 2012). Em apoio a isso, foi possível realizar a identificação de transcritos putativamente codificando resistência ao alumínio em *P. crisper*. Os sintomas da toxicidade do alumínio se baseiam na limitação do crescimento radicular, absorção de nutrientes, indução de estresse oxidativo e alterações na conformação do citoesqueleto (KOCHIAN, 1995; MATUSMOTO, 2000; SIVAGURU et al., 2000; YAMAMOTO, 2002; HORST; WANG; ETICHA, 2010). O mecanismo envolvido no processo de resistência ao alumínio em *P. crisper* pode ser similar ao existente em *C. subellipsoidea*, onde essa possivelmente baseia na interação entre o malato e o Al^{+3} , impedindo assim a sua entrada nas células (BLANC et al., 2012).

Pode-se também identificar transcritos putativamente codificando proteínas relacionadas com transportadores de outros metais, como: zinco e níquel, além do transportador Nramp5, responsável pelo transporte do metal, ferro. Estes são importantes para a manutenção do correto funcionamento das funções moleculares, pois servem como mecanismo de controle de entrada ou não para os seus respectivos nutrientes (BLABY-HAAS; MERCHANT, 2012).

O zinco, níquel e ferro são micronutrientes essenciais para a manutenção da vida (CHANEY, 1993; MARSCHNER, 2011; DIXON, 1975).

O zinco é absorvido preferencialmente sobre a forma de Zn^{2+} , possuindo ação importante sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas, fosfatos, RNA e ribossomos, sendo particularmente indispensável para o crescimento de plantas (BROADLEY et al., 2007).

O níquel é absorvido pelas plantas preferencialmente sobre a forma de Ni^{2+} , possuindo importantes atribuições quando relacionado com a produção de etileno, resistência a doenças e germinação de sementes (SMITH; WOOD-BURN, 1984; GRAHAM; WELCH; WALKER, 1985; BROWN; WELCH; CARRY, 1987).

O ferro é absorvido pelas plantas preferencialmente sobre a forma de Fe^{2+} , onde possui importantes funções relacionadas com a formação de enzimas e nos processos de respiração celular, fotossíntese, fixação de N_2 e transferências de elétrons (GUERINOT; Yi, 1994; MARENCO; LOPES, 2009).

Foram também identificados transcritos putativamente codificando a proteína transportadora de cálcio P-ATPase (Ca^{2+} -ATPase), esta é de suma importância para a execução do processo conhecido como bomba de cálcio em células eucarióticas (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003). Em plantas são encontradas nas membranas plasmáticas em geral, onde possuem como função o equilíbrio do cálcio presente no interior celular (BUSH, 1995; SZE et al., 2000; MIEDEMA et al., 2001). Aparentemente as proteínas transportadoras P-ATPase estão relacionadas com estratégias de adaptação desses organismos, como exposição ao estresse salino (BRESSAN et al., 1998), onde foi constatado por diferentes autores um aumento de sua expressão em condições de exposição a altos níveis dessa condição (WIMMERS; EW; BENNETT, 1992; PEREZ-PRAT et al., 1992; GEISLER et al., 2000b). As proteínas transportadoras P-ATPase também estão relacionadas com a alteração nos níveis de cálcio em plantas expostas a baixas temperaturas, removendo os íons de Ca^{2+} sobre essas condições (PUHAKAINEN et al. 1999). A presença dos transportadores de cálcio P-ATPase mostra envolvimento relacionado com condição de estresse existentes no ambiente em *P. crisper* é encontrada, possivelmente contribuindo para o correto funcionamento molecular sobre o ambiente antártico.

Além do mais, foram identificados transcritos putativamente codificando proteína pertencente a Superfamília dos Facilitadores Maioritários, mais especificamente, Transportador Geral de Substratos (MFS-GST). Proteínas do tipo têm como função transportar uma grande variedade de compostos, tais como, açúcares, oligossacarídeos, inositol, drogas, aminoácidos, nucleosídeos, metabólitos relacionados com o ciclo de Krebs e diferentes tipos de ânions e cátions (PAO et al., 1998). A presença desses transcritos em *P. crisper* pode representar mecanismos similares para com todo o processo de transporte.

4.2.3.3 Estresse osmótico

Graças ao local de maior recorrência em que *P. crisper* se encontra, esta está constantemente exposta a flutuações em relação a salinidade.

Sendo assim, baseando-se nos resultados advindos do algoritmo blast e termos (GO:0006970 – Tabela 3), pode-se identificar transcritos envolvidas com a capacidade de transporte desses nutrientes.

Tabela 3 – Transcritos putativamente relacionados com resistência ao estresse osmótico.

Proteína	Organismo	E-value
Subunidade reguladora do proteassoma 26S	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3.59e ⁻²⁷
Dihidroxi-ácido desidratase	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	9.34e ⁻³⁷
Oligo-transferase STT3	<i>Selaginella moellendorffii</i>	1.8e ⁻¹⁴
Pirofosfatase inorgânica vacuolar H ⁺	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	0.00
fosfatidilinositol 3-quinases	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	2.68e ⁻¹³

Fonte: do autor.

Dentre as sequências anotadas pode-se identificar transcritos putativamente codificando para a enzima pirofosfatase inorgânica vacuolar H⁺, esta possui elevada expressão em plantas durante tratamentos com altos índices de salinidade (COLOMBO; CERANA, 1993; ZINGARELLI *et al.*, 1994). Nestes casos, a ação da enzima pirofosfatase inorgânica vacuolar H⁺ atua produzindo um gradiente de prótons nas membranas vacuolares que permite o processo de antiporte Na⁺/H⁺, possibilitando o armazenamento de Na⁺ nestas estruturas e o correto controle do balanço osmótico (FUKUDA *et al.*, 2004).

Também foram encontrados transcritos putativamente codificando uma proteína do tipo subunidade reguladora de proteassoma 26S. Essas são relacionadas com a formação do complexo responsável pela degradação de proteínas em oligopeptídios, proteassoma 26S (Smalle *et al.*, 2003). Em experimentos foi demonstrado que a subunidade reguladora de proteassoma 26S possui expressão maior em relação ao grupo controle em resposta a condições de estresse osmótico. Acredita-se que através da conformação desse complexo ocorra a regulação de respostas a sinais promulgados por altos níveis de salinidade (ZANG; KOMATSU, 2006).

Transcritos putativamente codificando a oligo-transferase STT3, também foram identificados em *P. crispera*. Experimentos constataram que a oligo-

transferase STT3 possui a capacidade de controlar respostas ao estresse salino e osmótico em *Arabidopsis thaliana*. Nestes foi constatado que altos índices de NaCl possuem a capacidade de influenciar a conformação de proteínas presentes no retículo endoplasmático e interromper o ciclo celular desse organismo. Entretanto, a presença de STT3 em isoformas específicas pode anular a sensibilidade a exposição ao NaCl, assim como facilitar o processo de regulação de adaptação do retículo endoplasmático e a contínua progressão do ciclo celular (KOIWA et al., 2003). Análises posteriores devem ser realizadas para constatação das isoformas presentes em *P. crispera*, assim como se sua função é semelhante a encontrada em *A. thaliana*.

Também foi possível a identificação de transcritos putativamente codificando a proteína ácido-dihidroxi desidratase (DHAD). Em *A. thaliana* foi constatado que a ausência do mesmo acarreta na diminuição do acúmulo de isoleucinas, valinas e leucinas. Em consequência a isso, os exemplares com a ausência da proteína DHAD tornaram-se sensíveis a condições com altos níveis de salinidade (ZHANG et al., 2015). Alterações nos níveis de isoleucina, valinas e leucinas já haviam sido relacionadas com alterações na sensibilidade a salinidade (JOSHI et al., 2010), entretanto os mecanismos funcionais em que se baseiam não são conhecidos (ZHANG et al., 2015).

Baseando-se nos dados advindos do procedimento de anotação, pode-se ainda identificar transcritos putativamente codificando a enzima fosfatidilinositol 3-quinases. Aparentemente, a fosfatidilinositol 3-quinases possui a capacidade de regulação do metabolismo de prolina (LEPRINCE, 2014). A prolina se acumula no vacúolo ou citosol, sendo importante para a realização do ajuste osmótico sobre condições de baixo potencial hídrico (MARIJUAN; BOSCH, 2013; ASHRAF et al., 2011). Em *A. thaliana* observou-se que inibição do gene responsável pela fosfatidilinositol 3-quinases resulta na diminuição do acúmulo de prolina, levando a uma maior sensibilidade a exposição a salinidade (LEPRINCE, 2014). A presença desses transcritos pode sugerir a existência de mecanismos similares de regulação em relação ao estresse osmótico em *P. crispera*.

4.2.3.4 Baixas temperaturas

A capacidade de sobrevivência de *P. crisper* no ambiente antártico também está atrelada a presença de mecanismos de resistência a baixas temperaturas. O potencial de insaturação da membrana de organismos encontrados nessas condições se mostram como principal estratégia para esse fim. Entretanto, outros mecanismos podem ser encontrados, como a produção de proteínas anticongelantes.

Sendo assim, baseando-se nos resultados advindos do algoritmo blast e termos GO (GO:0009409 – Tabela 4), pode-se identificar transcritos envolvidas com a capacidade de resistência a baixas temperaturas.

Tabela 4 – Transcritos putativamente relacionados com resistência a baixas temperaturas.

Proteína	Organismo	E-value
Quitinase-anticongelante	<i>Saussurea Involucrata</i>	4.00e ⁻¹⁵
EBP1	<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	3.00e ⁻¹⁵
Tioredoxina induzida por frio	<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	4.00e ⁻²²

Fonte: do autor.

Baseando-se nos dados advindos do procedimento de anotação, pode-se identificar transcritos putativamente codificando proteínas anticongelantes conhecidas como quitinase-anticongelante (CHT-AFPs). Essas proteínas são encontradas abundantemente em algumas plantas quando expostas ao processo de aclimação a baixas temperaturas (PIHAKASKI-MAUNSBACK et al., 2001). Proteínas anticongelantes atuam ligando-se a cristais de gelo em formação, impedindo a sua propagação e consequente dano célula (DEVRIES, 1986; KNIGHT; DUMAN, 1986; EWART et al., 1999). Experimentos realizados com *Secale cereale*, demonstraram a existência de duas classes de CHT-AFPs, ambas apresentando funções anticongelantes, e uma, atividades relacionadas a defesa contra patógenos e resistência a doenças (YEH et al, 2000). Para

identificação da classe em que se encontra a CHT-AFP presente em *P.crispa*, análises posteriores necessitam ser realizadas.

Foram identificados também transcritos putativamente codificando a proteína EBP1. A proteína de ligação EBP1 é amplamente conservada em plantas, apresentando alta regulação quando em exposições ao frio, conferindo assim, tolerância ao frio e congelamento, além de propiciar a aceleração da síntese de ribossomos e fatores de transcrição sobre condições de estresse por baixas temperaturas (HORVÁTH et al., 2006; CAO et al., 2008).

Transcritos putativamente codificando Tioredoxina induzida por frio também foram identificados. A tioredoxina possui papel importante nos processos fotossintéticos ocorridos no cloroplasto e na sinalização redox (SCHURMANN; BUCHANAN, 2008). Entretanto, a exposição a baixas temperaturas desnatura parcialmente essas enzimas, levando a uma redução na atividade dos organismos (LEMAIRE, JACQUOT, MAKHATATADZE, 2000). Testes realizados in vitro demonstraram que a tioredoxina induzida por frio, um dos seis tipos diferentes de tioredoxina encontrados em plantas, possui capacidade de regulação inibitória da ação das proteínas quinase quando em condições de estresse, como baixas temperaturas (XIE et al., 2009).

Sendo assim, conclui-se que presença desses transcritos pode sugerir a existência de mecanismos similares para respostas a baixas temperaturas, auxiliando na manutenção e desenvolvimento de *P. crispa* ao ambiente antártico.

5. Capítulo 2 – Manuscrito

O artigo intitulado “Transcriptome dataset of Antarctic algae *Prasiola crista*” está disposto na forma na qual será submetido para o periódico *Frontier in Plant Science – Data Report* (ISSN: 1664-462X).

Transcriptome dataset of the Antarctic algae *Prasiola crispa*

Pablo Echeverria Macedo¹, Evelise Leis Carvalho¹, Filipe Zimmer Dezordi¹, Filipe de Carvalho Victória², Antonio Bastista Pereira², Gabriel da Luz Wallau³, Paulo Marcos Pinto¹

¹Applied Proteomics Laboratory, University of Pampa, São Gabriel, Brazil.

²Antarctic Studies Plant Core, National Institute of Antarctic Science and Technology for Environment Research, University of Pampa, São Gabriel, Brazil.

³Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Entomologia - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

*Correspondence:

paulopinto@unipampa.edu.br

Keywords: rna-seq, *Prasiola crispa*, transcriptome, extreme environments, illumina sequencing

1 Introduction

Prasiola crispa (Lightfoot) Kützing 1843 is a green macroalgae belonging to *Trebouxiophyceae* class, it is a cosmopolitan terrestrial thalloid that grows on moist soils, upper shoralines and near to bird colonies where is a great abundance of nutrients (Graham et al, 2009; John et al, 2002; Kováik and Pereira, 2001). In the Antarctic territory are between the most important primary producer (Kováik and Pereira, 2001; Wiencke and Clayton, 2002; Convey, 2007), where *Prasiola crispa* needs to tolerate extreme environments in the course of the seasons, such as repeated freeze and thaw cycles, physiological drought, limitation of nutrients, salinity stress and high levels of UV radiation (Jackson and Seppelt 1995, 1997, Lud et al., 2001, Kosugi et al., 2010, Jacob et al., 1992). The genes associated with these adaptive characteristics in *Prasiola crispa* remain unknown, therefore, to better understand the genetic and metabolic adaptations that make this organism survive on harsh environments, we sequenced its transcriptome. Transcriptomes represent

all the expressed fractions of genomes and are an alternative to facilitate the process of genetic analyses by removing complex genetic elements of large intergenic regions, introns and repetitive DNA (Riesgo et al., 2012). Transcriptome approaches are employed in a large number of assays involving non-model organisms or with lack reference genomes (Ekblom and Galindo, 2011). Among these organisms are the group of the algae. The data view about transcriptome assembly of algae consists in organisms belonging to different phylum, such as Prymnesiophyte, Chlorophyta, Haptophyta, Stramenopiles and Rhodophyta (Koid et al., 2014; Yazdi et al., 2011; Talarski; Manning; La Claire, 2016; Im et al, 2015; Shuangxiu, 2014). The metrics of *P. crispera* transcriptome, when compared with other organisms from the Chlorophyta phylum, in terms of contigs is in an intermediate position, where *Haematococcus pluvialis*, presents 62,635 contigs (Gwak et al., 2014), *Dunaliella tertiolecta* presents 34,301 contigs (Rismani-Yazdi et al., 2011) and *Chlamydomonas acidophila* with 29,706 contigs (Olsson et al., 2015). *P. crispera* when compared with organisms from the Trebouxiophyceae class, how *Chlorella minutissima* that presents 14,905 contigs (Yu et al., 2016) and *Trebouxia gelatinosa* with 19,601 contigs (Carniel et al., 2016), has the largest number of contigs. Until our knowledge, *P. crispera* represent the first transcriptome to algae from Prasiolales order published, being the molecular data related with *P. crispera* based only in sequences from the mitochondrial and plastid genome (Carvalho et al., 2015). Therefore, the purpose of this study was to identify the transcripts related with the successful adaptation and development of the *P. crispera* in the Antarctic territory, such as elucidate the molecular information about organism from Prasiolales order. The transcriptome assembly was deposited to a figshare.

Material and Methods

1.1 Algae Collection

Prasiola crispera was collected in areas near Arctowski Polish Station Region, Admiralty Bay, King George Island (61°50' – 62°15' S and 57°30' – 59°00'W), Antarctic.

1.2 Total RNA Extraction, Library Synthesis and RNA-seq

For obtainment Total RNA, RNAs from samples were extracted using RNAqueous Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) device according to the manufacturer's instructions. The transcriptome was sequenced by Macrogen Service using the Solexa-Illumina HiSeq 2500 next-generation sequencing platform device according to the manufacturer's instructions. A paired end reads with a read size of ~100 pb separated by insert size of 300 bp was employed.

1.3 Transcriptome *De novo* Assembly

Raw reads from data sets were filtered to remove the adapter sequences and low quality reads with Trimmomatic v 0.36 using default parameters (Bolger et al., 2014). After that we used a *denovo* multiple kmer assembly approach (assembling reads using kmers of 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95) since it has been shown as the best strategy to recover both high and low expression genes (Surget-Groba and Montoya-Burgos, 2010). We used SOAPdenovo-Trans (Xie et al., 2014) as Bruijn graph assembler. In order to assembly all the results from the different kmers evaluated we used a overlap-layout-consensus software CAP3 with default parameters (Huang and Madan., 1999). Due to the sequencing of a complex sample extracted from Antarctic soil we expected some amount of bacterial and fungi contamination. In order to clean our transcriptome, we performed a tblastx with default parameters (Camacho et al, 2009) search against all the NCBI nucleotide non-redundant database and recovered all contigs in which the best blast hit occurred with algae and plant sequences. Then we used Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012) with default parameters to recover only the reads that mapped against those *P. crispa* contigs.

Table 1 shows the statistics of the transcriptome assembly. They can be used for study such as biological process, molecular functions, cellular components, gene discovery and comparative transcriptome analysis with other *Algae* species.

2 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

3 Author Contributions

PMP: conducted the experiment; ELC, GLW, FZD, PEM: performed analysis on the data; PMP, FCV, ABP: conceived the project and acquired funding; PEM, PMP, GLW: wrote the manuscript.

4 Acknowledgments

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

5 References

Bolger, Anthony M., Marc Lohse, and Bjoern Usadel. 2014. "Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data." *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.

Camacho, C, G Coulouris, V Avagyan, N Ma, J Papadopoulos, K Bealer, and T L Madden. 2009. "BLAST plus: Architecture and Applications." *BMC Bioinformatics* 10 (421): 1. doi:Artn 421\nDoi 10.1186/1471-2105-10-421.

Carvalho, Evelise Leis, Gabriel da Luz Wallau, Darlene Lopes Rangel, Laís Ceschini Machado, Alexandre Freitas da Silva, Luiz Fernando Duarte da Silva, Pablo Echeverria Macedo, et al. 2015. "Draft Plastid and Mitochondrial Genome Sequences from Antarctic Alga *Prasiola Crispa*." *Genome Announcements* 3 (5): e01151-15. doi:10.1128/genomeA.01151-15.

Convey, P. (2007). Biogeography. In Riffenburgh, B. [Ed.] *Encyclopedia of the Antarctic*. Vol. 1: A-K. Routledge, New York.

David M. John, Brian A. Whitton and Alan J. Brook. 2002. "The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae." *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14 (1): 105–105. doi:10.1002/aqc.579.

David M. John, Brian A. Whitton, Alan J. Brook. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, Volume 1*. Cambridge University Press, 25 de abr de 2002 - 702 páginas

Ekblom, R, and J Galindo. 2011. "Applications of next Generation Sequencing in Molecular Ecology of Non-Model Organisms." *Heredity* 107 (1): 1–15.
doi:10.1038/hdy.2010.152.

Graham, L. E., Graham, J. M. & Wilcox, L. W. 2009. *Algae*. Pearson Education, Inc., San Francisco, 616 pp.

Gwak, Y., Y.-s. Hwang, B. Wang, M. Kim, J. Jeong, C.-G. Lee, Q. Hu, D. Han, and E. Jin. 2014. "Comparative Analyses of Lipidomes and Transcriptomes Reveal a Concerted Action of Multiple Defensive Systems against Photooxidative Stress in *Haematococcus Pluvialis*." *Journal of Experimental Botany* 65 (15): 4317–34.
doi:10.1093/jxb/eru206.

Huang, X, and a Madan. 1999. "CAP 3: A DNA Sequence Assembly Program." *Genome Research* 9 (906): 868–77. doi:10.1101/gr.9.9.868.

Im, Sungoh, San Choi, Mi Sook Hwang, Eun-Jeong Park, Won-Joong Jeong, and Dong-Woog Choi. 2015. "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* 27 (3): 1343–53.
doi:10.1007/s10811-014-0406-3.

Jackson, A E, and R D Seppelt. 1995. "The Accumulation of Proline in *Prasiola Crispa* during Winter in Antarctica." *Physiologia Plantarum* 94 (1): 25–30.
doi:10.1111/j.1399-3054.1995.tb00779.x.

Jackson, A. E., and Seppelt, R. D. (1997). Physiological adaptations to freezing and UV radiation exposure in *Prasiola crispa*, an Antarctic terrestrial alga. In Battaglia, B., Valencia, J. & Walton, D. W. H. [Eds.] *Antarctic Communities: Species, Structure, and Survival*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 226–233.

Jacob, A, C Wiencke, H Lehmann, and G O Kirst. 1992. "Physiology and Ultrastructure of Desiccation in the Green-Alga *Prasiola-Crispa* From Antarctica." *Botanica Marina* 35 (4): 297–303. doi:10.1515/botm.1992.35.4.297.

Koid, Amy E, Zhenfeng Liu, Ramon Terrado, Adriane C. Jones, David A. Caron and Karla B. Heidelberg. 2014. Comparative Transcriptome Analysis of Four Prymnesiophyte Algae. Plos one. dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097801

Kosugi, Makiko, Yuya Katashima, Shimpei Aikawa, Yukiko Tanabe, Sakae Kudoh, Yasuhiro Kashino, Hiroyuki Koike, and Kazuhiko Satoh. 2010. "Comparative Study on the Photosynthetic Properties of *Prasiola* (Chlorophyceae) and *Nostoc* (Cyanophyceae) from Antarctic and Non-Antarctic Sites." *Journal of Phycology* 46 (3): 466–76. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00831.x.

Kováčik, Lubomír, and Antonio Batista Pereira. 2001. "Green Alga *Prasiola Crispa* and Its Lichenized Form *Mastodia Tesselata* in Antartic Environment: General Aspects." *Nova Hedwigia* 123 (January 2001): 465–78.

Langmead, Ben, and Steven L Salzberg. 2012. "Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2." *Nat Methods* 9 (4): 357–59. doi:10.1038/nmeth.1923.

Lud, Daniela, Anita G J Buma, Willem Van De Poll, Tanja C W Moerdijk, and Ad H L Huiskes. 2001. "DNA Damage and Photosynthetic Performance in the Antarctic Terrestrial Alga *Prasiola Crispa* Ssp. Antarctica (Chlorophyta) under Manipulated UV-B Radiation." *Journal of Phycology* 37 (4): 459–67. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.037004459.x.

Riesgo, Ana, Sónia C S Andrade, Prashant P Sharma, Marta Novo, Alicia R Pérez-Porro, Varpu Vahtera, Vanessa L González, Gisele Y Kawachi, and Gonzalo Giribet. 2012. "Comparative Description of Ten Transcriptomes of Newly Sequenced Invertebrates and Efficiency Estimation of Genomic Sampling in Non-Model Taxa." *Frontiers in Zoology* 9 (1): 33. doi:10.1186/1742-9994-9-33.

Rismani-Yazdi, Hamid, Berat Z Haznedaroglu, Kyle Bibby, and Jordan Peccia. 2011. "Transcriptome Sequencing and Annotation of the Microalgae *Dunaliella Tertiolecta*:

Pathway Description and Gene Discovery for Production of next-Generation Biofuels.” *BMC Genomics* 12 (1): 148. doi:10.1186/1471-2164-12-148.

Surget-Groba Y, Montoya-Burgos J. 2010. “Optimization of de Novo Transcriptome Assembly from next-Generation Sequencing Data.” *Genome Research*, 1432–40. doi:10.1101/gr.103846.109.1432.

Talarski, Aimee, Schonna R. Manning, and John W. La Claire II .2016. “Transcriptome analysis of the euryhaline alga, *Prymnesium parvum* (Prymnesiophyceae): effects of salinity on differential gene expression”. *Phycologia* 55 (1): . dx.doi.org/10.2216/15-74.1

Wiencke, C. and Clayton, M. N. (2002). Antarctic Seaweeds. Synopses of the Antarctic Benthos Vol. 9. A.R.G. Gantner Verlag KG, Ruggell, Lichtenstein.

Wu, Shuangxiu, Jing Sun, Shan Chi, Liang Wang, Xumin Wang, Cui Liu, Xingang Li, Jinlong Yin, Tao Liu, and Jun Yu. 2014. “Transcriptome Sequencing of Essential Marine Brown and Red Algal Species in China and Its Significance in Algal Biology and Phylogeny.” *Acta Oceanologica Sinica* 33 (2): 1–12. doi:10.1007/s13131-014-0435-4.

Xie, Yinlong, Gengxiong Wu, Jingbo Tang, Ruibang Luo, Jordan Patterson, Shanlin Liu, Weihua Huang, et al. 2014. “SOAPdenovo-Trans: De Novo Transcriptome Assembly with Short RNA-Seq Reads.” *Bioinformatics* 30 (12): 1660–66. doi:10.1093/bioinformatics/btu077.

Yu, Mingjia, Shanjun Yang, and Xiangzhi Lin. 2016. “De-Novo Assembly and Characterization of *Chlorella Minutissima* UTEX2341 Transcriptome by Paired-End Sequencing and the Identification of Genes Related to the Biosynthesis of Lipids for Biodiesel.” *Marine Genomics* 25 (February): 69–74. doi:10.1016/j.margen.2015.11.005.

Carniel, Fabio Candotto, Marco Gerdol, Alice Montagner, Elisa Banchi, Gianluca De Moro, Chiara Manfrin, Lucia Muggia, Alberto Pallavicini, and Mauro Tretiach. 2016. “New Features of Desiccation Tolerance in the Lichen Photobiont *Trebouxia*

Gelatinosa Are Revealed by a Transcriptomic Approach.” *Plant Molecular Biology* 91 (3): 319–39. doi:10.1007/s11103-016-0468-5.

Rismani-Yazdi, Hamid, Berat Z Haznedaroglu, Kyle Bibby, and Jordan Peccia. 2011. “Transcriptome Sequencing and Annotation of the Microalgae *Dunaliella Tertiolecta*: Pathway Description and Gene Discovery for Production of next-Generation Biofuels.” *BMC Genomics* 12 (1): 148. doi:10.1186/1471-2164-12-148.

Olsson, Sanna, Fernando Puente-Sánchez, Manuel J. Gómez, and Angeles Aguilera. 2015. “Transcriptional Response to Copper Excess and Identification of Genes Involved in Heavy Metal Tolerance in the Extremophilic Microalga *Chlamydomonas Acidophila*.” *Extremophiles* 19 (3): 657–72. doi:10.1007/s00792-015-0746-1.

TABLE 1

Table 1 – Characteristics of *Prasiola crispera* assembly

Attributes	Value
Total raw reads	21,489,488
Total processed reads	2,616,714
Number of contigs	37,679
N50	1,389
Median contig size	731
longest contig	10,065
Shortest contig	100
Contigs > 500 nt	25,222 (67.12 %)
Contigs > 1K nt	13,204 (35.14 %)

6. CONCLUSÃO

Através de plataformas computacionais conseguimos montar e anotar o transcriptoma da alga antártica *P. crispera*, assim como ocorrido com outras algas pertencentes a diferentes filos, como o filo Chlorophyta e a classe Trebouxiophyceae.

A anotação funcional destes transcritos, embora tenha apresentado poucos resultados específicos, permitiu a obtenção de informações preliminares relacionadas com as estratégias utilizadas por *P. crispera* para a sobrevivência em ambiente Antártico. Pode-se também constatar baseando-se nos resultados advindos de anotação, que tanto *P. crispera* quanto outras espécies de algas presentes ao filo Chlorophyta, possivelmente compartilham informações genéticas, podendo ser estas derivadas de conteúdo gênico conservado e podendo servir futuramente como estratégia para melhoria do procedimento de anotação.

Ademais, análises mais aprofundadas se fazem necessárias, levando a uma melhor compreensão do metabolismo e das estratégias moleculares presentes em *P. crispera* para sobrevivência a ambientes extremos.

7. PERSPECTIVAS

- Realização da identificação de outros possíveis transcritos putativamente relacionados com os mecanismos de sobrevivência de *P. crispa* ao ambiente Antártico;
- Mineração de todos os transcritos relacionados com outras funções metabólicas putativamente presentes em *P. crispa*;
- Melhoramento da anotação do transcriptoma de *P. crispa* com base em genomas de outros organismos pertencentes ao filo Chlorophyta já disponibilizados;

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, Amy et al. **Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.** Science, v. 252, n. 5013, p. 1651–1656, 1991.

ALTSCHUL, Stephen et al. **Basic local alignment search tool.** Journal of molecular biology, v. 215, n. 3, p. 403–10, 1990.

ASHBURNER, Michael et al. **Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium.** Nature genetics, v. 25, n. 1, p. 25–9, 2000.

ASHRAF, Salama et al. **Drought Tolerance.** p.249–296, 2011.

BERRIDGE, Michael; BOOTMAN, Martin; RODERICK, Llewelyn. **Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 4, n. 7, p. 517–529, 2003.

BISCHOF, Kai et al. **Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. I. Sensitivity of photosynthesis to ultraviolet radiation.** Marine Biology, v. 140, n. 6, p. 1097–1106, 2002.

BLABY-HAAS, Crysten; MERCHANT, Sabeeha. **The ins and outs of algal metal transport.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, v. 1823, n. 9, p. 1531–1552, 2012.

BLANC, Guillaume et al. **The Chlorella variabilis NC64A Genome Reveals Adaptation to Photosymbiosis, Coevolution with Viruses, and Cryptic Sex.** The Plant Cell, 22, p. 2943–2955, 2010.

BLANC, Guillaume et al. **The genome of the polar eukaryotic microalga Coccoomyxa subellipsoidea reveals traits of cold adaptation.** Genome Biology, v. 13, n. 5, p. R39, 2012.

BOCK, Niko et al. **Metabolic changes of the Antarctic green alga Prasiola crispa subjected to water stress investigated by in vivo ³¹P NMR.** Journal of Experimental Botany, v. 47, n. 2, p. 241–249, 1996.

BOLGER, Anthony.; LOHSE, Martin.; USADEL, Björn. **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** Bioinformatics, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BRESSAN, Ray; HASEGAWA, Paul; PARDO, Jose. **Plants use calcium to resolve salt stress.** Trends in Plant Science, v. 3, n. 11, p. 411–412, 1998.

BROADLEY, Martin et al. **Zinc in plants.** New Phytologist, v. 173, n. 4, p. 677–702, 2007.

BROWN, Patrick; WELCH, Ross; CARY, Earle. **Nickel: a micronutrient essential for higher plants.** Plant physiology, v.85,n.3,p. 801-803, 1987.

BUSH, Douglas. **Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling.** Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 46, n. 1, p. 95–122, 1995.

CAO, Pengxiu et al. **Characterization of multiple cold induced genes from *Ammopiptanthus mongolicus* and functional analyses of gene AmEBP1.** Plant Molecular Biology, v. 69, n. 5, p. 529–539, 2009.

CHEN, Sixue et al. **Functional Characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a Subfamily of Arabidopsis Half-molecule ATP-binding Cassette Transporters Implicated in Iron Homeostasis.** Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 29, p. 21561–21571, 2007.

COLOMBO, Roberta; CERANA, Raffaella. **Enhanced Activity of Tonoplast Pyrophosphatase in NaCl-Grown Cells of *Daucus carota*.** Journal of Plant Physiology, v. 142, n. 2, p. 226–229, 1993.

COMPEAU, Phillip; PEVZNER, Pavel.; TESLER, Glenn. **How to apply de Bruijn graphs to genome assembly.** Nature Biotechnology, v. 29, n. 11, p. 987–991, 2011.

CONESA, Ana et al. **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** Bioinformatics, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

CONVEY Peter. Biogeography. In Riffenburgh, B. [Ed.] **Encyclopedia of the Antarctic, 1, AK.** Routledge, New York; p. 154-60, 2007.

CONWAY, Thomas; BROMAGE, Andrew. **Succinct data structures for assembling large genomes.** Bioinformatics, v. 27, n. 4, p. 479–486, 2011.

CULLUM, Rebecca; ALDER, Olivia.; HOODLESS, Pamela. **The next generation: Using new sequencing technologies to analyse gene regulation.** Respirology, v. 16, n. 2, p. 210–222, 2011.

DAVIES, Peter; HEW, Choy. **Biochemistry of fish antifreeze proteins.** FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 4, n. 8, p. 2460–8, 1990.

DEVRIES, Arthur. **Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water.** Methods in enzymology, v. 127, p. 293–303, 1986.

DIXON, Nicholas et al. **Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel?** Journal of the American Chemical Society, v. 97, n. 14, p. 4131–3, 1975.

DÖHLER, Gottfried. **Effect of UV-B (280–320 nm) radiation on the ¹⁵N-nitrate assimilation of some algae,** Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 7, 79–84, 1988.

DÖHLER, Gottfried. **UV-Effects on the Nitrogen Metabolism of Marine Phytoplankton and Adaptation to UV Radiation. Stratospheric Ozone Depletion/UV-B Radiation in the Biosphere.** p.163–174, 1994. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

EWART, Kathryn; LIN, Qing.; HEW, Choy. **Structure, function and evolution of antifreeze proteins.** Cellular and molecular life sciences: CMLS, v. 55, n. 2, p. 271–83, 1999.

FELLER, Georges; GERDAY, GERDAY, Charles. **Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation.** Nature reviews. Microbiology, v. 1, n. 3, p. 200–8, 2003.

FRENETTE CHARRON, Jean. **Identification, Expression, and Evolutionary Analyses of Plant Lipocalins.** PLANT PHYSIOLOGY, v. 139, n. 4, p. 2017–2028, 2005.

FUKUDA, Atsunori. **Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley.** Journal of Experimental Botany, v. 55, n. 397, p. 585–594, 2004.

GARBARY, David; TARAKHOVSKAYA, Elena. **Marine macroalgae and associated flowering plants from the Keret Archipelago, White Sea, Russia.** ALGAE, v. 28, n. 3, p. 267–280, 2013.

GEISLER, Markus et al. **The ACA4 gene of Arabidopsis encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast.** Plant Physiol. 124: 1814-1827. 2000b.

GRAHAM, Linda; GRAHAM, James; WILCOX, Lee. **Algae.** Pearson Education, Inc., San Francisco, p. 616, 2009.

GRAHAM, Robin; WELCH, Ross; WALKER, Colin. **A role for nickel in the resistance of plants to rust.** In: Australian Agronomy Conference, 3, Hobart. Annals. Hobart: Australian Society of Agronomy, 337p, 1985.

GUERINOT Mart; YI Ying. **Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available.** Plant Physiology 104: 815-820, 1994.

GUIRY, Michel. & GUIRY, Caoilte. **AlgaeBase.** Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em <http://www.algaebase.org>. Acessado em 17.01.2017

HENIKOFF, Steven et al. **Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras.** Science (New York, N.Y.), v. 278, n. 5338, p. 609–14, 1997.

HOECK, Van de Hoeck et al. **Algae: a introduction to phycology.** Cambridge, Cambridge University Press, p.623, 1995.

HOLZINGER, Andreas et al. **Ultrastructure and photosynthesis in the supralittoral green macroalga Prasiola crispa from Spitsbergen (Norway) under UV exposure.** Phycologia, v. 45, n. 2, p. 168–177, 2006.

HORST, Walter; WANG, Yunxia; ETICHA, Dejene. **The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review.** Annals of Botany, v. 106, n. 1, p. 185–197, 2010.

HORVÁTH, Beatrix et al. **EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants.** The EMBO journal, v. 25, n. 20, p. 4909–20, 2006.

HWANG, Yong-Sic; JUNG, Gyeongseo; JIN, Eonseon. **Transcriptome analysis of acclimatory responses to thermal stress in antarctic algae.** Biochemical and biophysical research communications, 14 mar.. v. 367, n. 3, p. 635–41. 2008.

JACOB, Andreas et al. **Physiological responses of the Antarctic green alga *Prasiola crispa* spp. antarctica under salinity stress.** J. Plant Physiol. 139: 57–62, 1991.

JACOB, Andreas. **Physiology and ultrastructure of Antarctic green alga *Prasiola crispa* ssp. antarctica subjected to osmotic stress and desiccation.** Rep. Polar Res. 102: 1–144, 1992.

JACOB, Andreas et al. **Changes in the ultrastructure of *Prasiola crispa* spp. antarctica under salinity stress.** Botanica Acta 105: 41–46, 1992a.

JACOB, Andreas et al. **Physiology and ultrastructure in the green alga *Prasiola crispa* from Antarctica.** Botanica Marina 35: 297–303, 1992b.

JOHN, David. **The freshwater algal flora of the British Isles.** Cambridge University Press, Cambridge, p. 433-468, 2002.

JONES, Houston. **Snow chemistry and biological activity: a particular perspective on nutrient cycling. Seasonal Snowpacks.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg p.173–228, 1991.

JORDAN, Brian. **The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective.** Adv. Bot. Res.;22:97–162, 1996.

JOSHI, Vijay et al. **Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress.** Amino acids, v. 39, n. 4, p. 933–47, 2010.

KANEHISA, Minoru et al. **KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.** Nucleic acids research, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KANG, Joohyunet et al. **Plant ABC Transporters.** The Arabidopsis Book, v. 9, p. e0153, 2011.

KARSTEN, Ulf; KIRST, Gunter; WIENCKE, Christian. **Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) accumulation in green macroalgae from polar to temperate regions: interactive effects of light versus salinity and light versus temperature.** Polar Biology, v. 12, n. 6–7, 1992.

KARSTEN, Ulf; WIENCKE, Christian; KIRST, Gunter. **The Effect of Salinity Changes Upon the Physiology of Eulittoral Green Macroalgae from Antarctica and Southern Chile: II INTRACELLULAR INORGANIC IONS AND ORGANIC COMPOUNDS.** Journal of Experimental Botany, v. 42, n. 12, p. 1533–1539, 1991.

KARSTEN, Ulf, et al. **Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: prasiola and its relatives from the trebouxiophyceae (chlorophyta)1**. *Journal of Phycology*, v. 41, n. 3, p. 557–566, 2005.

KEELING, Patrick et al. **The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing**. *PLoS biology*, v. 12, n. 6, p. e1001889, 2014.

KIM, Do-Young et al. **AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in Arabidopsis**. *Plant Physiology*, v. 140, n. 3, p. 922–932, 2006.

KIRST, Gunter. **Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae**. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 41, n. 1, p. 21–53, 1990.

KLEIN, Markus; BURLA, Bo; MARTINOIA, Enrico. **The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants**. *FEBS letters*, v. 580, n. 4, p. 1112–22, 2006.

KNIGHT, Charles; DUMAN, Joseph. **Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: A possible cryoprotective role**. *Cryobiology*, v. 23, n. 3, p. 256–262, 1986.

KOBAYASI, Yan. **Prasiola crispa and its allies in the Alaskan Arctic and Antarctica**. *Bulletin of the Natural Sciences Museum of Tokyo*, 10: 211–220, 1967.

KOCHIAN, Leon. **Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants**. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 46, n. 1, p. 237–260, 1995.

KOIWA, Hisashi et al. **The STT3a subunit isoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress**. *The Plant cell*, v. 15, n. 10, p. 2273–84, 2003.

KOVÁČIK, Lubomir.; PEREIRA, Antonio. **Green alga Prasiola crispa and its lichenized form Mastodia tesselata in Antarctic environment: general aspects**. *Nova Hedwigia, Beiheft*, 123, p. 465-478, 2001.

KRIENITZ, Lothar et al. **Taxonomic reassessment of the genus Mychonastes (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species**. *Phycologia*, v. 50, n. 1, p. 89–106, 2011.

KRINSKY, Norman. **Antioxidant functions of carotenoids**. *Free radical biology & medicine*, v. 7, n. 6, p. 617–35, 1989.

LANE, Thomas et al. **Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology**. *BMC Biotechnology*, v. 16, n. 1, p. 47, 2016.

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

LENZ, Petra et al. **De Novo Assembly of a Transcriptome for *Calanus finmarchicus* (Crustacea, Copepoda) – The Dominant Zooplankter of the North Atlantic Ocean.** (A. Ianora, Org.) PLoS ONE, v. 9, n. 2, p. e88589, 2014.

LEPRINCE, Anne-Sophie et al. **Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of proline catabolism in *Arabidopsis thaliana*.** Frontiers in Plant Science, v. 5, 2015.

LEWIS, Louise; MCCOURT, Richard. **Green algae and the origin of land plants.** American Journal of Botany, v. 91, n. 10, p. 1535–1556, 2004.

LI, Rui.; BRAWLEY, Susan. **Improved survival under heat stress in intertidal embryos (*Fucus* spp.) simultaneously exposed to hypersalinity and the effect of parental thermal history.** Marine Biology, v. 144, n. 2, p. 205–213, 2004.

LIPKIN, Yuk.; BEER, Sven.; ESHEL, Amram. **The Ability of *Porphyra linearis* (Rhodophyta) to Tolerate Prolonged Periods of Desiccation.** Botanica Marina, v. 36, n. 6, 1993.

Los, Dmitry; MURATA, Norio. **Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals.** Biochimica et biophysica acta, v. 1666, n. 1–2, p. 142–57, 2004.

LUD, Daniela et al. **Dna damage and photosynthetic performance in the antarctic terrestrial alga *prasiola crispa* ssp. Antarctica (chlorophyta) under manipulated uv-b radiation.** Journal of Phycology, v. 37, n. 4, p. 459–467, 2001.

LÜTZ, Chaterine et al. **Physiological adaptation to early spring conditions in green overwintering leaves of some alpine plants.** Phytion 45(3), 139–156, 2005.

MACLEAN, Daniel.; JONES, Jonathan.; STUDHOLME, David. **Application of “next-generation” sequencing technologies to microbial genetics.** Nature reviews. Microbiology, v. 7, n. 4, p. 287–96, 2009.

MARDIS, Elaine. **Next-generation DNA sequencing methods.** Annual review of genomics and human genetics, v. 9, p. 387–402, 2008.

MARENCO Ricardo; LOPES, Nei. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral.** UFV, p.267-297, 2009.

Margesin, Rosa; SCHINNER, Franz. **Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology.** Journal of Biotechnology, v. 33, n. 1, p. 1–14, 1994.

MARSCHNER, Petra; CROWLEY, David; RENGEL, Zed. **Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods.** Soil Biology and Biochemistry, v. 43, n. 5, p. 883–894, 2011.

MATASCI, Naim et al. **Data access for the 1,000 Plants (1KP) project.** GigaScience, v. 3, n. 1, p. 17, 2014.

MATSUMOTO, Hideaki. **Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants.** International review of cytology, v. 200, p. 1–46, 2000.

MATTOX, Ross; STEWART, Kelly. **Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology.** In: Irvine DEG, John DM, editors. The systematic of the green algae. London: Academic Press, p. 29-72, 1984.

MCDONALD, Tami.; WARD, John. **Evolution of Electrogenic Ammonium Transporters (AMTs).** Frontiers in Plant Science, v. 7, 2016.

MIAO, Xiaoling; WU, Qingyu. **Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil.** Bioresource Technology, v. 97, n. 6, p. 841–846, 2006.

MIEDEMA, Heleen et al.. **Calcium uptake by plant cells--channels and pumps acting in concert.** Trends in plant science, v. 6, n. 11, p. 514–9, 2001.

MILLER, Jason; KOREN, Sergey.; SUTTON, Granger. **Assembly algorithms for next-generation sequencing data.** Genomics, v. 95, n. 6, p. 315–27, 2010.

MOCK, Thomas; KROON, Bernd. **Photosynthetic energy conversion under extreme conditions--I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms.** Phytochemistry, v. 61, n. 1, p. 41–51, 2002.

MONIZ, Mónica et al. **Molecular phylogeny of antarctic prasiola (prasiolales, trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity(1).** Journal of phycology, v. 48, n. 4, p. 940–55, 2012.

MORGAN-KISS, Rachel et al. **Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments.** Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 70, n. 1, p. 222–52, 2006.

MORGAN-KISS, Rachel et al. **Differential thermal effects on the energy distribution between photosystem II and photosystem I in thylakoid membranes of a psychrophilic and a mesophilic alga.** Biochimica et biophysica acta, v. 1561, n. 2, p. 251–65, 2002.

NICHOLS, David et al. **Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of Shewanella gelidimarina.** Applied and environmental microbiology, v. 66, n. 6, p. 2422–9, 2000.

PAO, Stephanie et al; PAULSEN, Ian.; SAIER, Milton. **Major facilitator superfamily.** Microbiology and molecular biology reviews. MMBR, v. 62, n. 1, p. 1–34, 1998.

PASZKIEWICZ, Konrad; STUDHOLME, David. **De novo assembly of short sequence reads.** Briefings in Bioinformatics, v. 11, n. 5, p. 457–472, 2010.

PEREZ-PRAT, Eva et al. **Induction of a Putative Ca-ATPase mRNA in NaCl-Adapted Cells.** Plant physiology, v. 100, n. 3, p. 1471–8, 1992.

PIGHIN, Jamie et al. **Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter.** Science (New York, N.Y.), v. 306, n. 5696, p. 702–4, 2004.

PIHAKASKI-MAUNSBACH, Kaarina et al. **Genes encoding chitinase-antifreeze proteins are regulated by cold and expressed by all cell types in winter rye shoots.** *Physiologia plantarum*, v. 112, n. 3, p. 359–371, 2001.

PINTÓ-MARIJUAN, Marta; MUNNÉ-BOSCH, Sergi. **Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants.** *Trends in Plant Science*, v. 18, n. 12, p. 660–666, 2013.

POP, Mihai. **Genome assembly reborn: recent computational challenges.** *Briefings in bioinformatics*, v. 10, n. 4, p. 354–66, 2009.

PUHAKAINEN, Tuula et al. **Cold acclimation enhances the activity of plasma membrane Ca²⁺ ATPase in winter rye leaves.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 3, p. 231–239, 1999.

QUEVILLON, Emmanuel et al. **InterProScan: protein domains identifier.** *Nucleic Acids Research*, Vol. 33 W116–W120, 2005.

RADFORD, Alan et al. **Application of next-generation sequencing technologies in virology.** *The Journal of general virology*, v. 93, n. Pt 9, p. 1853–68, 2012.

RAVEN Peter et al. **Biologia Vegetal** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.. 906p, 2001.

REITAN, Kjell; RAINUZZO, Jose.; OLSEN, Yngvar. **Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae1.** *Journal of Phycology*, v. 30, n. 6, p. 972–979, 1994.

RICHARDSON, John et al. **Difference in the mechanisms of the cold and heat induced unfolding of thioredoxin h from *Chlamydomonas reinhardtii*: spectroscopic and calorimetric studies.** *Biochemistry*, v. 39, n. 36, p. 11154–62, 2000.

RIESGO, Ana et al. **Comparative description of ten transcriptomes of newly sequenced invertebrates and efficiency estimation of genomic sampling in non-model taxa.** *Frontiers in Zoology*, v. 9, n. 1, p. 33, 2012.

RISMANI-YAZDI, Hamid et al. **Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels.** *BMC Genomics*, v. 12, n. 1, p. 148, 2011.

RINDI, Fabio et al. **Molecular phylogeny of the green algal order prasiolales (trebouxiophyceae, chlorophyta) 1.** *Journal of Phycology*, v. 43, n. 4, p. 811–822, 2007.

ROSER, David et al. **Polyol and sugar content of terrestrial plants from continental Antarctica.** *Antarctic Science*, v. 4, n. 4, 1992.

ROUTABOUL, Jean-Marc.; FISCHER, Steven; BROWSE, John. **Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures.** *Plant physiology*, v. 124, n. 4, p. 1697–705, 2000.

SAHOO, Dinabandhu; SECKBACH, Joseph (eds.), **The Algae World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**. Springer Netherlands. p. 786, 2015.

SANGER, Frederick; NICKLEN, Steve.; COULSON, Alan. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.

SCHATZ, Peer. **Assembly of Large Genomes using Cloud Computing**. p. 1165–1173, 2010. Disponível em: <<http://cbcb.umd.edu/~mschatz/Presentations/2010-07-23.Illumina.pdf>>.

SCHÜRMAN, Peter; BUCHANAN, Bob. **The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis**. Antioxidants & redox signaling, v. 10, n. 7, p. 1235–74, 2008.

SEIDLITZ, Han et al. **Solar radiation at the Earth's surface**. In: Giacomoni, P.U. (Ed.), Comprehensive Series in Photosciences 3, Sun Protection in Man. Elsevier, Amsterdam, pp. 705–738, 2001.

SHIFRIN, Neil; CHISHOLM Sallie. **Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles**. Journal of Phycology, v. 17, n. 4, p. 374–384, 2008.

SIVAGURU, Mayandi et al. **Aluminum-induced 1 \rightarrow 3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata**. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. Plant physiology, v. 124, n. 3, p. 991–1006, 2000.

SMALLE, Jan et al. **The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling**. The Plant cell, v. 15, n. 4, p. 965–80, 2003.

SMITH, Celia; BERRY, Joseph. **Recovery of photosynthesis after exposure of intertidal algae to osmotic and temperature stresses: comparative studies of species with differing distributional limits**. Oecologia, v. 70, n. 1, p. 6–12, 1986.

SMITH, Nathan; WOODBURN, James. **Nickel and ethylene involvement in the senescence of leaves and flowers**. Naturwissenschaften, v 71, n. 4, p. 210-211, 1984.

STEIN, Lincoln. **Genome annotation: from sequence to biology**. Nature Reviews Genetics, v. 2, n. 7, p. 493–503, 2001.

SURGET-GROBA, Yann; MONTOYA-BURGOS, Juan. **Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data**. Genome research, v. 20, n. 10, p. 1432–40, 2010.

SZE, Heven et al. **Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast**. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, v. 51, p. 433–62, 2000.

TEARLE, P.W. **Cryptogamic carbohydrate release and microbial response during spring freeze- thaw cycles in Antarctic fellfield fines**, Soil Biol. Biochem. 19, 381–390,1987.

THOMASHOW, Michael. **Role of cold-responsive gene in plant freezing tolerance.** *Plant Physiol.* 118:1–7, 1998.

THOMPSON, Peter.; HARRISON, Paul; WHYTE, John. **Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton.** *Journal of Phycology*, v. 26, n. 2, p. 278–288, 1990.

TURMEL, Monique et al. **The complete mitochondrial DNA sequences of *Nephroselmis olivacea* and *Pedinomonas minor*.** Two radically different evolutionary patterns within green algae. *The Plant cell*, v. 11, n. 9, p. 1717–30, 1999.

VENTER, Craig et al. **The Sequence of the Human Genome.** *Science*, v. 291, n. 5507, p. 1304–1351, 2001.

VINCENT, Warwick; ROY, Suzanne. **Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery.** *Environmental Reviews*, v. 1, n. 1, p. 1–12, 1993.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.** *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WARD, Judson.; PONNALA, Lalit; WEBER, Courtney. **Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants.** *American journal of botany*, v. 99, n. 2, p. 267–76, 2012.

WHITE, Lewis.; WYNN-WILLIAMS, David; RUSSELL, Nicholas. **Diversity of thermal responses of lipid composition in the membranes of the dominant culturable members of an Antarctic fellfield soil bacterial community.** *Antarctic Science*, v. 12, n. 3, 2000.

WHITTAKER, Robert.; MARGULIS, Lynn. **Protist classification and the kingdoms of organisms.** *Biosystems*, v. 10, n. 1–2, p. 3–18, 1978.

WICKETT, Norman et al. **Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants.** *Proceedings of the national academy of sciences*, 11 nov. 2014. v. 111, n. 45, p. E4859–E4868.

WIENCKE C; CLAYTON MN. **Antarctic seaweeds. Synopses of the Antarctic benthos, A.R.G.** Gantner Verlag KG, Ruggell, Lichtenstein. 2002. 9, p. 239.

WIMMERS, Larry; EWING, Nicholas, BENNETT, Alan. **Higher plant Ca²⁺-ATPase: primary structure and regulation of mRNA abundance by salt.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9205-9209, 1992.

XIE, Guosheng et al. **A cold-induced thioredoxin h of rice, OsTrx23, negatively regulates kinase activities of OsMPK3 and OsMPK6 in vitro.** *FEBS letters*, v. 583, n. 17, p. 2734–8, 2009.

XIE, Yinlong et al. **SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads.** *Bioinformatics*, v. 30, n. 12, p. 1660–1666, 2014.

YAMAMOTO, Yoko et al. **Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells.** *Plant Physiology*, vol. 128 pg. 63-72, 2002.

YEH, Sansun et al. **Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals.** *Plant physiology*, v. 124, n. 3, p. 1251–64, 2000.

YING, Shao-Yao. **Complementary DNA libraries: an overview.** *Molecular biotechnology*, v. 27, n. 3, p. 245–52, 2004.

ZANG, Xin; KOMATSU, Setsuko. **A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice.** *Phytochemistry*, v. 68, n. 4, p. 426–437, 2007.

ZHANG, Chun et al. **Dihydroxyacid dehydratase is important for gametophyte development and disruption causes increased susceptibility to salinity stress in Arabidopsis.** *Journal of experimental botany*, v. 66, n. 3, p. 879–88, 2015.

ZINGARELLI, Luisa; ANZANI, Paola; LADO, Piera. **Enhanced K⁺-stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of Acer pseudoplatanus.** *Physiologia Plantarum*, v. 91, n. 3, p. 510–516, 1994.