



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Herculano Cella

**Regulação da radiação na fotoproteção em *Phaeodactylum tricornutum*
(Bacillariophyceae)**

Florianópolis
2024

Herculano Cella

**Regulação da radiação na fotoproteção em *Phaeodactylum tricornutum*
(Bacillariophyceae)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Dr. Roberto Bianchini Derner
Coorientadora: Dra. Maria Risoleta Freire Marques

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Cella, Herculano

Regulação da radiação na fotoproteção em *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) / Herculano Cella ; orientador, Roberto Bianchini Derner, coorientadora, Maria Risoleta Freire Marques, 2024.

91 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. estresse luminoso. 3. fotossíntese. 4. microalga. 5. nível de transcritos. I. Derner, Roberto Bianchini . II. Marques, Maria Risoleta Freire . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Herculano Cella

**Regulação da radiação na fotoproteção em *Phaeodactylum tricornutum*
(Bacillariophyceae)**

O presente trabalho em nível de Doutorado será avaliado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Claudio Manoel Rodrigues De Melo, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Clei Endrigo Piazza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Fabio Felipe Gabriel Roselet, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Aquicultura pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho
À minha amada família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Karim e Paulo, cujo amor, apoio e sacrifícios me guiaram ao longo desta jornada. À minha esposa e parceira Camila Lisarb Velasquez Bastolla, por estar sempre ao meu lado. Você é minha fonte de inspiração e seu amor é o que me motiva a ser cada vez melhor todos os dias. Te amo!! Aos meus sogros Mara e Luiz e aos meus cunhados Jerônimo e Karen pelo carinho e compreensão.

Ao meu orientador Roberto Bianchini Derner e ao Rafael Garcia Lopes pelos valiosos ensinamentos e pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA). Agradeço por sempre acreditarem no meu potencial e por me motivarem a superar meus limites.

Ao LCA, o qual fiz parte por mais de dez anos. Levo comigo não apenas o conhecimento, experiências e amizades, mas também as memórias de um ambiente que por muitas vezes considerei minha segunda casa, e até a primeira em alguns momentos. Foram anos fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus grandes amigos e sócios que conheci no LCA, Henrique Venâncio e Camila Nader. Juntos enfrentamos desafios, superamos obstáculos e celebramos conquistas. Vocês são parte essencial de cada avanço que realizamos.

À minha coorientadora Maria Risoleta Freire Marques, por sempre acreditar em mim e me encorajar a seguir meus objetivos. Seu apoio e acolhimento foram essenciais nesta etapa. Ao professor Afonso Bainy por todo o auxílio prestado.

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) pelo suporte nas análises moleculares deste trabalho. Agradeço à equipe do LABCAI pela amizade e ensinamentos.

Aos professores do Laboratório de Ficologia (LAFIC): Leonardo Rubi Rörig, José Bonomi Barufi, Carlos Yure Oliveira e Paulo Horta, pelo espaço cedido para realização do segundo experimento desta tese e por estarem sempre dispostos em ajudar. Um agradecimento especial aos professores Leo e Barufi por suas habilidades acolhedoras e pelo suporte constante. Agradeço vocês por suas contribuições inestimáveis. Vocês são estupendos!

Ao professor Marcelo Maraschin e à equipe do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) pela ajuda nas análises químicas.

À banca examinadora da tese de doutorado – membros titulares: Dr. Fabio Felipe Gabriel Roselet, Dr. Clei Endrigo Piazza, Dr. Claudio Manoel Rodrigues De Melo; e membros suplentes: Dra. Flávia Lucena Zacchi, Dr. Guilherme Razzera e Dra. Marília Nardelli Siebert. Agradeço pela dedicação e pela disponibilidade na revisão e correção deste documento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina – professores e servidores – pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Em especial, agradeço ao Carlito Klunk pela ajuda nas questões administrativas.

À CAPES pela bolsa de estudos e ao MCTI, CNPq e à FINEP, pelo financiamento indireto desta tese.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

Artigo gerado a partir desta tese até a realização da defesa (15/12/2023)

CELLA, H. *et al.* PAR regulation of photoprotection in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae): Roles of doses and irradiances. JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, v. 35, p. 1-15, **2023**.

Outros artigos publicados durante o período de doutorado

1. BASTOLLA, C.L.V. *et al.* Comparative biochemical and molecular responses of biotransformation and antioxidant systems in three species of *Crassostrea* (Sacco, 1897) oysters exposed to chrysene. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY C-TOXICOLOGY & PHARMACOLOGY, v. 270, p. 109642, **2023**.
2. PCHARA, F.F.R. *et al.* Investigating Carbon Dioxide Transfer for Intensive Cultures of the Microalga *Tetrademus obliquus*. Bioenergy Research, v. 18, p. 10622, **2023**.
3. BUCHELI, J. *et al.* Bacterial assemblages structure in intensive cultivations of the microalga *Tetrademus obliquus*. JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY (ONLINE), v. -, p. 1-11, **2023**.
4. NADER, C. *et al.* Effect of different cultivation conditions on the production of volatile organic compounds by the microalgae *Arthrospira platensis* and *Chlorella* sp.. Journal of Applied Phycology, v. 34, p. 203-217, **2022**.
5. SILVA, V.F. *et al.* Effects of Microalgae Addition and Fish Feed Supplementation in the Integrated Rearing of Pacific White Shrimp and Nile Tilapia Using Biofloc Technology. ANIMALS, v. 12, p. 1527, **2022**.
6. BASTOLLA, C.L.V. *et al.* Molecular changes in oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) from aquaculture areas of Santa Catarina Island bays (Florianópolis, Brazil) reveal anthropogenic effects. CHEMOSPHERE, v. 307, p. 135735, **2022**.
7. OLIVEIRA, C.Y.B. *et al.* A comparison of harvesting and drying methodologies on fatty acids composition of the green microalga *Scenedesmus obliquus*. BIOMASS & BIOENERGY, v. 132, p. 105437, **2020**.

8. CONCEIÇÃO, D. *et al.* The effect of light intensity on the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, p. 1-9, **2020**.
9. VENANCIO, H.C. *et al.* Surface-to-volume ratio influence on the growth of *Scenedesmus obliquus* in a thin-layer cascade system. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, p. 1-9, **2020**.
10. BAUER, C.M. *et al.* In vitro fucoxanthin production by the *Phaeodactylum tricorutum* diatom. *Studies in Natural Products Chemistry*. 1ed.: Elsevier, **2019**, v. 63, p. 211-242 (**Capítulo de livro**).

RESUMO

O potencial biotecnológico das diatomáceas está cada vez mais reconhecido devido a produção de compostos de interesse, entre eles a fucoxantina por exemplo, utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica e na aquicultura, devido aos seus benefícios nutracêuticos. Dentre as diatomáceas, *Phaeodactylum tricornutum* se destaca por ser organismo-modelo para explorar processos fotobiológicos fundamentais e que levem a produção deste composto. Investigar como diferentes doses de energia luminosa afetam os mecanismos de captação da luz, eficiência fotossintética e fotoproteção, é crucial para entender como as radiações fotossinteticamente ativa (PAR) e ultravioleta (UVR) influenciam o crescimento e outras atividades metabólicas em *P. tricornutum*. No primeiro trabalho foi utilizado a Lei de Bunsen-Roscoe para determinação de diferentes doses de energia luminosa (irradiância x fotoperíodo) somente com PAR. Maiores concentrações de clorofila-*a*, fucoxantina e diadinoxantina foram influenciadas por baixa irradiância, enquanto os parâmetros de fluorescência, a diatoxantina e os genes que regulam o ciclo das xantofilas foram potencializados pelas maiores doses de energia luminosa. Além disso, foi encontrado um padrão de transcrição entre as isoformas dos genes zeaxantina epoxidase (*ZEP1* e *ZEP2*) assim como nas isoformas dos genes violaxantina de-epoxidase-like (*VDL1* e *VDL2*). Este estudo demonstrou que tanto as doses quanto as irradiâncias afetam as respostas de fotoproteção e fotoaclimatação. No segundo trabalho, a mesma Lei foi aplicada, mas para UVR. O aumento da dose de UVR apresentou efeitos negativos nos parâmetros de fotossíntese e no teor dos pigmentos envolvidos no processo de captação de luz. A diatoxantina e o aumento na regulação dos níveis de transcritos dos genes *VDE*, *VDL1* e *VDL2*, promoveu uma tentativa de ativar mecanismos de fotoproteção, sugerindo uma modificação na capacidade de *P. tricornutum* em responder ao estresse luminoso. Estudar a regulação dos mecanismos de fotoproteção a nível fisiológico e molecular da biossíntese de fucoxantina em *P. tricornutum* é de grande importância para a otimização da produção desse pigmento de alto valor comercial. À medida que o conhecimento sobre a produção de carotenoides se expande, novas estratégias de cultivo podem ser desenvolvidas para maximizar a produção desse composto natural com potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Aquicultura, estresse luminoso, fotossíntese, microalga, nível de transcritos.

ABSTRACT

The biotechnological potential of diatoms is increasingly recognized due to the production of compounds of interest, including fucoxanthin, for example, which is used in the food, pharmaceutical, and aquaculture industries due to its nutraceutical benefits. Among diatoms, *Phaeodactylum tricornerutum* stands out as a model organism for exploring fundamental photobiological processes that lead to the production of this compound. Investigating how different light energy doses affect light capture mechanisms, photosynthetic efficiency, and photoprotection is crucial to understand how photosynthetically active radiation (PAR) and ultraviolet radiation (UVR) influence the growth and other metabolic activities in *P. tricornerutum*. In the first study, the Bunsen-Roscoe Law was used to determine different light energy doses (irradiance x photoperiod) with only PAR. Higher concentrations of chlorophyll-*a*, fucoxanthin, and diadinoxanthin were influenced by low irradiance, while fluorescence parameters, diatoxanthin, and genes regulating the xanthophyll cycle were enhanced by higher light energy doses. Additionally, a transcription pattern was found among the isoforms of zeaxanthin epoxidase genes (*ZEP1* and *ZEP2*) as well as in the isoforms of violaxanthin de-epoxidase-like genes (*VDL1* and *VDL2*). This study demonstrated that both doses and irradiance levels affect photoprotection and photoacclimation responses. In the second study, the same Law was applied, but for UVR. Increasing UVR dose had negative effects on photosynthesis parameters and the content of pigments involved in the light capture process. Diatoxanthin and the upregulation of transcript levels of *VDE*, *VDL1*, and *VDL2* genes promoted an attempt to activate photoprotection mechanisms, suggesting a modification in *P. tricornerutum* capacity to respond to light stress. Studying the regulation of photoprotection mechanisms at the physiological and molecular levels of fucoxanthin biosynthesis in *P. tricornerutum* is of great importance for optimizing the production of this high-value commercial pigment. As knowledge about carotenoid production expands, new cultivation strategies can be developed to maximize the production of this naturally occurring compound with biotechnological potential.

Keywords: Aquaculture, microalgae, high light stress, photosynthesis, transcript level.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Fotografia da diatomácea <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP1055/1.	19
Figura 2. Carotenoides presentes na microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20
Figura 3. Esquema gráfico do espectro luminoso.	21
Figura 4. Composição do espectro luminoso em função da profundidade da água do mar. ...	22
Figura 5. Localização dos pigmentos fotossintéticos presentes no FCP.	23
Figura 6. Esquema gráfico da absorção de luz durante a excitação da clorofila no complexo antena.	24
Figura 7. Esquema gráfico do efeito da radiação solar absorvida para fotossíntese ou dissipada.	25
Figura 8. Ciclos VAZ (A) e Ddx-Dtx (B) em <i>P. tricornutum</i>	26

CAPITULO 2

Figure 1. LED-light source spectrum used in the experimental procedures.	33
Figure 2. Photosynthesis-irradiance response curve.	34
Figure 3. Specific growth rates in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$).	40
Figure 4. Light absorption values in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$).	41
Figure 5. Chlorophyll-a fluorescence parameters as Fv/Fm (A), NPQ (B) and ETR (C and D) in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.	42
Figure 6. Chl-a (A) and Chl-c (B) concentrations in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.	43
Figure 7. Fx (A and B), Ddx (C and D) and Dtx (E) concentrations in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.	45
Figure 8. De-epoxidation state in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.	46
Figure 9. Gene transcript levels of ZEP1 (A), ZEP2 (B) and ZEP3 (C) in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.	47

Figure 10. Gene transcript levels of <i>VDE</i> (A and B), <i>VDL1</i> (C) and <i>VDL2</i> (D) in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.	48
Figure 11. Heatmap based on Pearson's correlation coefficients between dependent variables of <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cells exposed to different light energy doses.	50

CAPITULO 3

Figura 1. Espectros de radiação das fontes de luz PAR e UVR (A) e os tipos de radiação UVR (B).	64
Figura 2. Esquema visual do delineamento experimental.	66
Figura 3. Acúmulo de biomassa (A) e absorção de energia luminosa (B) em culturas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).	72
Figura 4. Parâmetros de fluorescência como F_v/F_m (A), NPQ (B) and ETR (C) em culturas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).	74
Figura 5. Concentração de clorofila- <i>a</i> (Chl- <i>a</i>), clorofila- <i>c</i> (Chl- <i>c</i>), Diadinoxantina (Ddx), diatoxantina (Dtx) e Fucoxantina (Fx) em culturas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).	76
Figura 6. Estado de de-epoxidação (DES) em culturas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).	77
Figura 7. Níveis de transcritos dos genes associados à epoxidação <i>ZEP1</i> (A), <i>ZEP2</i> (B), <i>ZEP3</i> (C) em culturas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$). .	79
Figura 8. Níveis de transcritos dos genes associados à de-epoxidação <i>VDE</i> (A), <i>VDL1</i> (B), <i>VDL2</i> (C) em culturas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).	80

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

- Table 1. Treatments applied to *Phaeodactylum tricornutum* cultures based on the light energy doses (irradiance × L:D cycle).35
- Table 2. Photosynthetic parameters calculated from fluorescence measurements.36
- Table 3. List of primers used for amplification of target genes-related to fucoxanthin biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.38

CAPITULO 3

- Tabela 1. Valores das doses e intensidades de radiação UV para cada tratamento exposto.....65
- Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes-alvo relacionados à biossíntese de fucoxantina pela microalga *Phaeodactylum tricornutum*.70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS: absorvância
ABSt: absortância
cDNA: DNA complementar
Chl: clorofila
CO₂: dióxido de carbono
DNA: ácido desoxirribonucleico
Ddx: diadinoxantina
Dtx: diatoxantina
DES: estado de de-epoxidação; do inglês *de-epoxidation state*
DW: biomassa seca; do inglês *dry weight*
EPA: ácido eicosapentaenoico; do inglês *eicosapentaenoic acid*
ETR: taxa de transporte de elétrons; do inglês *electron transport rate*
E_{PAR}: irradiância
F: fluorescência estável adaptada à luz (fluorescência emitida em uma situação normal de fotossíntese)
F_m: fluorescência máxima adaptada ao escuro (centros de reação fechados)
F_m' : fluorescência máxima adaptada à luz (centros de reação fechados)
F_o: fluorescência mínima adaptada ao escuro (centros de reação abertos)
F_v: fluorescência variável adaptada ao escuro
F_v/F_m: rendimento quântico máximo no PSII
F_{II}: fração do total de clorofila a no PSII
FCP: complexo proteico fucoxantina-clorofila a/c; do inglês *fucoxanthin-chlorophyll protein complex*
Fucoxantina: Fx
gDNA: DNA genômico
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; do inglês *high-performance liquid chromatography*
LCA: Laboratório de Cultivo de Algas
LCA-AM: Composição do meio Conway (1966) modificado no LCA/UFSC, empregado nas culturas de microalgas marinhas
mRNA: RNA mensageiro
NPQ: dissipação não-fotoquímica; do inglês *non-photochemical quenching*
PAR: radiação fotossinteticamente ativa; do inglês *photosynthetically active radiation*
PAM: fluorescência com pulso de amplitude modulada; do inglês *pulse-amplitude-modulation*
PCR: reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*
PSII: fotossistema II
qPCR: PCR quantitativo em tempo real
RNA: ácido ribonucleico
ROS: espécies reativas de oxigênio; do inglês *reactive oxygen species*
RUBISCO: enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
UVR: radiação ultravioleta; do inglês *ultraviolet radiation*
UV-A: radiação ultravioleta tipo A
UV-B: radiação ultravioleta tipo B
UV-C: radiação ultravioleta tipo C
VAZ: ciclo violaxantina-zeaxantina
VDE: enzima violaxantina de-epoxidase
VDE: gene *violaxantina de-epoxidase*
VDL1: gene *violaxantina de-epoxidase-like1*

VDL2: gene *violaxantina de-epoxidase-like2*

ZEP: enzima zeaxantina epoxidase

ZEP1: gene *zeaxantina epoxidase1*

ZEP2: gene *zeaxantina epoxidase2*

ZEP3: gene *zeaxantina epoxidase3*

Y_{II}: rendimento quântico efetivo no PSII

SUMÁRIO

CAPITULO 1	18
1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 MICROALGAS NA AQUICULTURA	18
1.2 DIATOMÁCEAS E <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	19
1.3 RADIAÇÃO	21
1.4 EFEITOS DA PAR E UVR NA FOTOSSÍNTESE	22
1.5 FOTOINIBIÇÃO E FOTOPROTEÇÃO	25
1.6 JUSTIFICATIVA	27
Objetivo Geral	28
Objetivos Específicos	28
CAPÍTULO 2	29
PAR REGULATION OF PHOTOPROTECTION IN <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (BACILLARIOPHYCEAE): ROLES OF DOSES AND IRRADIANCES	29
2.1 INTRODUCTION	31
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	33
2.2.1 Culture conditions	33
2.2.2 Growth evaluation and light absorption	35
2.2.3 Chlorophyll-<i>a</i> fluorescence measurements	36
2.2.4 Determination of chlorophyll concentrations and pigment analysis	37
2.2.4 RNA purification and cDNA synthesis	37
2.2.5 Quantitative real-time PCR analysis (qPCR)	38
2.2.6 Statistical analysis	39
2.3 RESULTS	39
2.3.1 Growth performance	39
2.3.2 Chlorophyll-<i>a</i> fluorescence in PSII	41
2.3.3 Pigment content	43
2.3.4 Carotenoid biosynthesis genes transcript levels	46
2.3.5 Pearson correlation	49
2.4 DISCUSSION.....	50
2.5 CONCLUSION.....	54
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	54
2.7 FUNDING STATEMENT.....	54

2.8	AUTHOR'S CONTRIBUTIONS	54
2.9	DATA AVAILABILITY	54
2.10	DECLARATION OF COMPETING INTEREST.....	55
2.11	REFERENCES	55
CAPÍTULO 3		60
EFEITOS DA RADIAÇÃO UV NA FOTOPROTEÇÃO E FOTOSSÍNTESE DE		
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CULTIVADA SOB DIFERENTES DOSES DE		
ENERGIA LUMINOSA.....		60
3.1	INTRODUÇÃO	62
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	63
3.2.1	Cepa e manutenção dos cultivos	63
3.2.2	Fontes de radiação	63
3.2.3	Tratamentos	65
3.2.4	Determinação da biomassa	66
3.2.5	Determinação do coeficiente de atenuação da luz	66
3.2.6	Absorção da luz.....	67
3.2.7	Medições da fotossíntese a partir da fluorescência da Clorofila- <i>a</i> do fotossistema II	67
3.3.8	Determinação do teor de pigmentos.....	67
3.3.9	Extração de RNA total, transcrição reversa e avaliação dos níveis de transcritos via qPCR.....	68
3.3.10	Análises estatísticas.....	70
3.3	RESULTADOS	70
3.3.1	Biomassa e absorção da luz.....	70
3.3.2	Medições da fluorescência da clorofila- <i>a</i> no PSII.....	73
3.3.3	Teor de pigmentos fotossintetizantes	75
3.3.4	Nível de transcritos dos genes envolvidos no ciclo Ddx-Dtx	77
3.4	DISCUSSÃO	81
3.5	CONCLUSÕES	83
3.6	REFERÊNCIAS	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS		87
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL		88

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 MICROALGAS NA AQUICULTURA

A aquicultura desempenha um papel crucial em diversos aspectos, contribuindo significativamente para a economia global, a segurança alimentar, a conservação dos recursos naturais e o desenvolvimento sustentável. Com a população global em constante crescimento, a demanda por alimentos nutritivos e acessíveis aumenta exponencialmente, e neste caso, a aquicultura se torna uma resposta à crescente demanda global por alimentos provenientes de ambientes aquáticos (FAO, 2022).

As microalgas são um grupo diversificado de organismos unicelulares fotossintetizantes e representam um recurso valioso na aquicultura. Estes micro-organismos desempenham um papel fundamental na fotossíntese devido à sua capacidade de adaptação a condições ambientais extremas, alta produtividade e capacidade de absorver dióxido de carbono (CO₂), sendo responsáveis por produzir grande parte do oxigênio atmosférico através da fotossíntese oxigênica (BARSANTI *et al.*, 2008). As microalgas são uma fonte rica em nutrientes como proteínas, lipídeos, vitaminas e carotenoides, por exemplo, sendo especialmente adequados como alimento vivo para larvas de peixes, camarões e moluscos. Seu tamanho microscópico permite a ingestão eficiente, fornecendo os nutrientes essenciais necessários para crescimento inicial dos animais que as recebem como alimento (DERNER *et al.*, 2006).

Além disso, as microalgas têm a capacidade de absorver nutrientes em excesso, como nitrogênio e fósforo, presentes nos efluentes da aquicultura, tornando-as uma solução eficaz para mitigar a poluição e melhorar a qualidade da água (RIZWAN *et al.*, 2018). A utilização de microalgas no tratamento de efluentes da aquicultura representa uma abordagem inovadora e ambientalmente amigável para lidar com os resíduos gerados pela produção aquícola (BORGES *et al.*, 2005; MAGNOTTI *et al.*, 2015). Essa prática também pode gerar benefícios econômicos adicionais, transformando os resíduos em recursos úteis, sendo uma estratégia que se alinha com os princípios da aquicultura sustentável e oferece um potencial significativo para a indústria aquícola e o meio ambiente (TROELL *et al.*, 2023).

1.2 DIATOMÁCEAS E PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

As diatomáceas (Classe Bacillariophyceae) constituem um grupo significativo de microalgas fotossintetizantes tipicamente abundantes em ecossistemas marinhos e dulcícolas e possuem parede celular composta por uma frústula de sílica (BRODRICK *et al.* 2019).

Dentro deste grupo, o gênero *Phaeodactylum* é composto por apenas uma espécie, *Phaeodactylum tricornutum* (Fig. 1). Trata-se de uma diatomácea penada marinha que vem ganhando atenção especial devido à sua facilidade de cultivo e à sua capacidade de sintetizar compostos naturais que são utilizados em muitas aplicações biotecnológicas (FALCIATORE, 2020). Dentre esses compostos, se destaca a produção de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (ácido eicosapentaenoico, por exemplo) (LOPES *et al.*, 2019, CONCEIÇÃO *et al.*, 2020) e de carotenoides (BAUER *et al.*, 2019), ambos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (LIU *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2020).

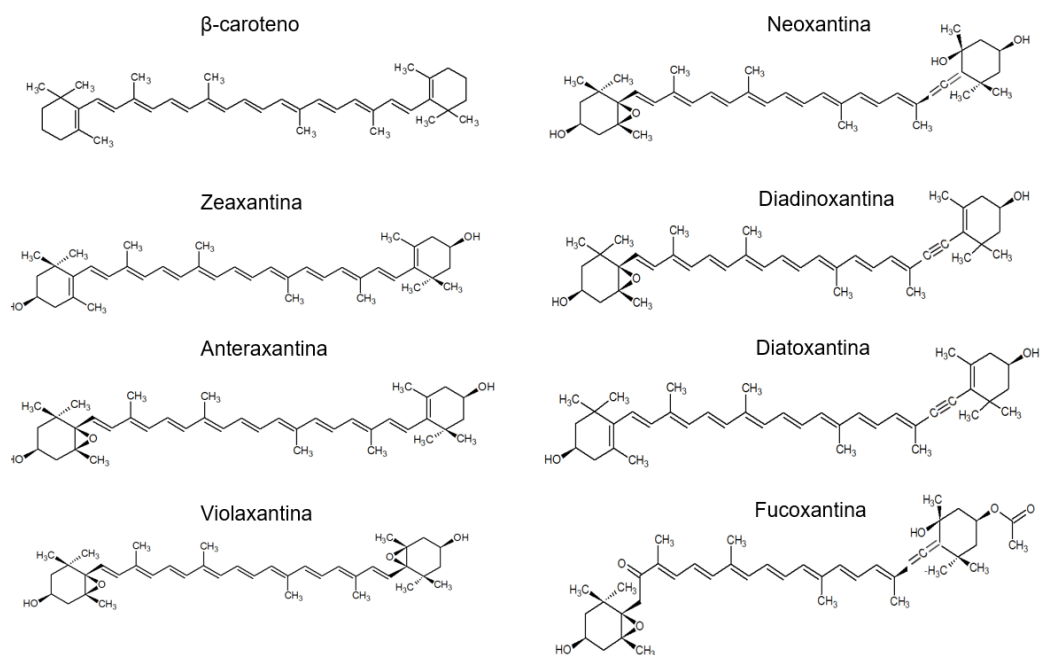
Figura 1. Fotografia da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* CCAP1055/1.



Fonte: Laboratório de Cultivo de Algas (2021)

Os carotenoides são metabólitos secundários e formados por quarenta átomos de carbono, e podem ser classificados em dois grupos: os carotenos (estrutura química composta somente por hidrocarbonetos) e as xantofilas (carotenos oxigenados) (KUCZYNSKA *et al.*, 2015). As diatomáceas apresentam oito tipos de carotenoides (Fig. 2) em sua composição como o β -caroteno e as xantofilas zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, neoxantina, diadinoxantina, diatoxantina e fucoxantina (DAMBEK *et al.*, 2012).

Figura 2. Carotenoides presentes na microalga *Phaeodactylum tricorutum*.



Fonte: adaptado de Lohr e Wilhelm (1999).

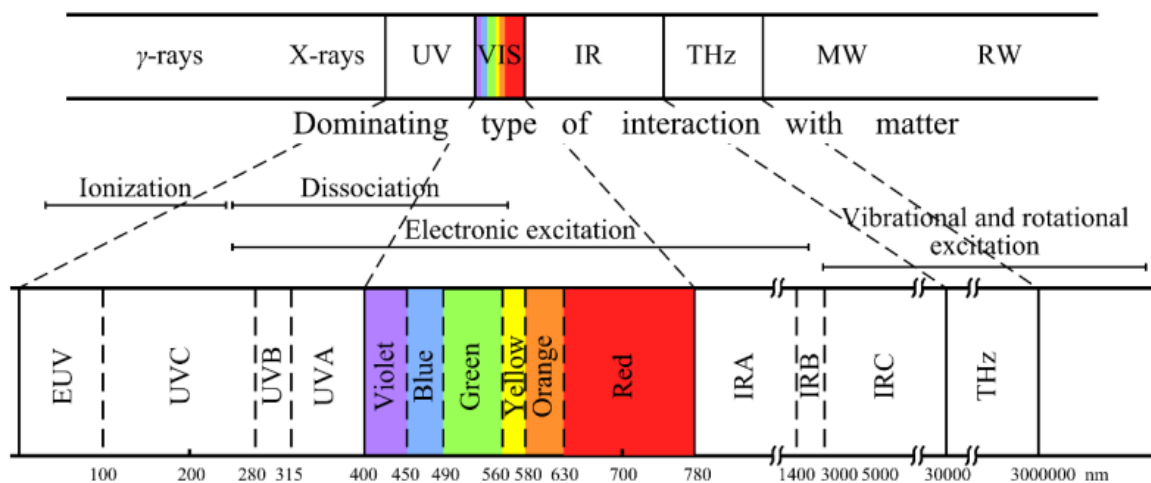
Phaeodactylum tricorutum é uma das duas únicas diatomáceas cujos genomas foram completamente sequenciados (BOWLER *et al.*, 2008), sendo isso muito interessante para o desenvolvimento de estudos genéticos e moleculares que contribuam para avanços em biotecnologia, sustentabilidade ambiental e compreensão da biologia dessa diatomácea marinha (FALCIATORE *et al.*, 2020).

Além das aplicações biotecnológicas, o sucesso ecológico das diatomáceas, especialmente para as espécies planctônicas, está sujeito a mudanças constantes devido à turbulência da água. Também, as células estão expostas a diferentes intensidades de luz e espectros luminosos, dependendo da profundidade em que se encontram (KUCZYNSKA *et al.*, 2015).

1.3 RADIAÇÃO

A luz solar desempenha um papel fundamental como a principal fonte de energia luminosa para os organismos fotoautotróficos. A radiação solar, que inclui a Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR) e a Radiação Ultravioleta (UVR) são alguns dos fatores que influenciam no desenvolvimento das microalgas. A PAR é definida como a faixa de radiação eletromagnética entre 400 e 780 nm (Figura 3) e corresponde à luz visível (TUCHIN, 2015).

Figura 3. Esquema gráfico do espectro luminoso.

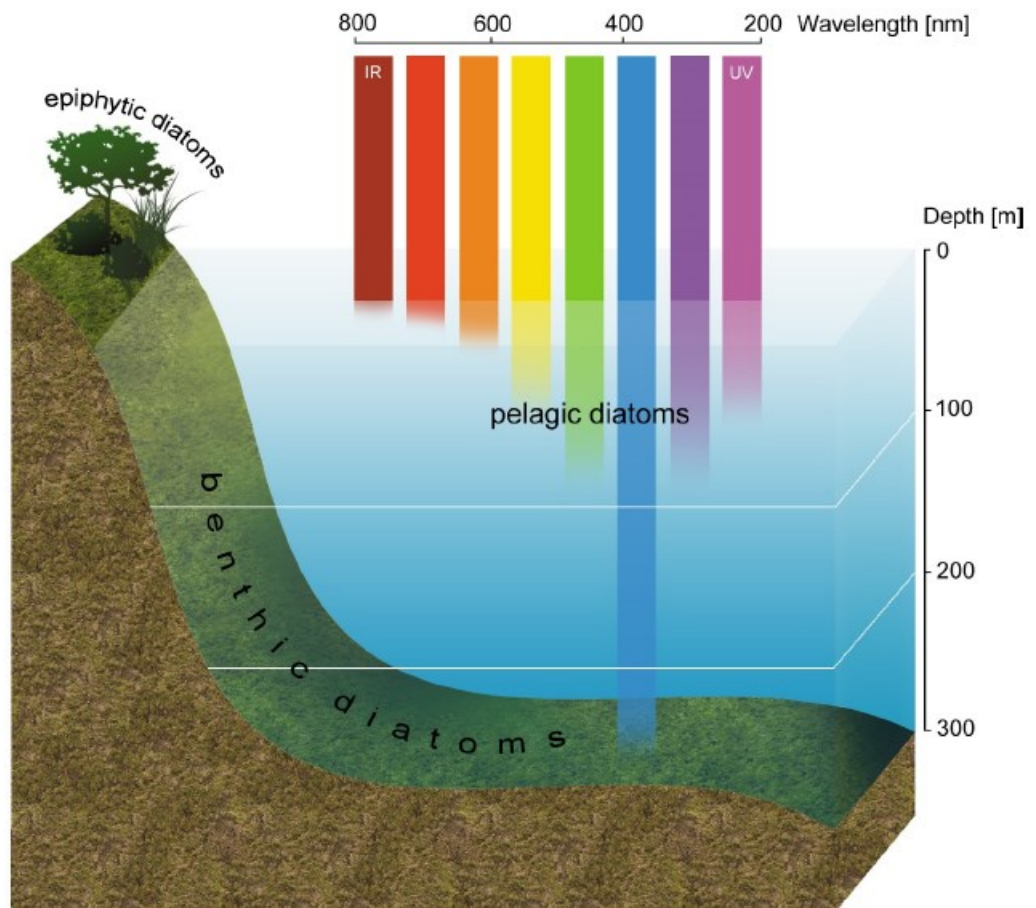


Fonte: Tuchin (2015).

Essa faixa específica de comprimentos de onda engloba as frequências de luz mais eficazes que são absorvidas pelos pigmentos presentes nas microalgas para realizar a fotossíntese (VALLE *et al.*, 2014). No caso das diatomáceas marinhas, que contribuem significativamente para a produtividade primária nos oceanos (cerca de 40%), enfrentam uma grande variabilidade na disponibilidade de luz para o crescimento (SERÔDIO; LAVAUD, 2020). À medida que a luz solar penetra na água (Fig. 4), os comprimentos de onda mais longos, como o vermelho (630 nm) por exemplo, são absorvidos rapidamente pela água, resultando em uma composição espectral diferente em profundidades variadas. As diatomáceas que vivem próximas à superfície da água, absorvem uma luz enriquecida em comprimentos de onda vermelho, enquanto aquelas que são encontradas em águas mais profundas, absorvem os comprimentos de onda mais curtos, como a luz azul (450 nm) (DUCHÊNE *et al.*, 2023). Por outro lado, a UVR (Fig. 3) inclui três comprimentos de onda: UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) e UV-C (100-280 nm) que apresentam diferentes níveis de energia e causam diferentes impactos nas células das diatomáceas. A UV-A é considerada menos prejudicial que a UV-B e

a UV-C, mas todas podem afetar de alguma forma a fotossíntese e a capacidade das diatomáceas de se aclimatar às condições de luz variáveis (JIN *et al.*, 2023).

Figura 4. Composição do espectro luminoso em função da profundidade da água do mar.



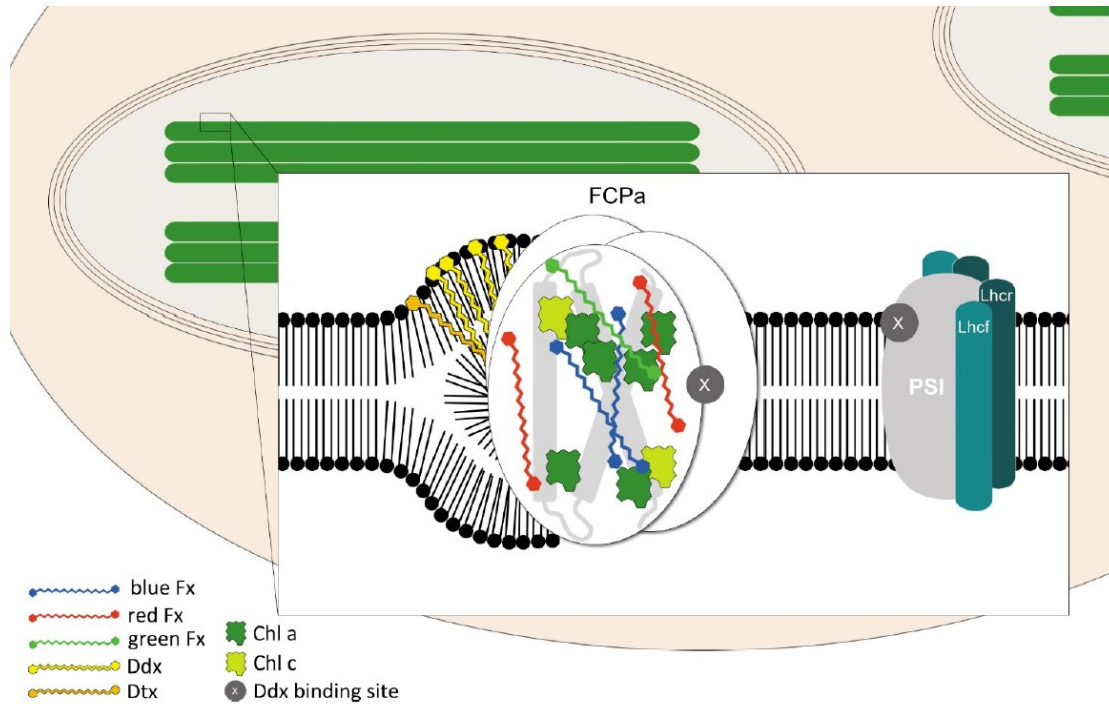
Fonte: Kuczynska *et al.* (2015).

1.4 EFEITOS DA PAR E UVR NA FOTOSSÍNTESE

A absorção de luz pelas diatomáceas é mediada principalmente pelos pigmentos fotossintetizantes. A fucoxantina, que é o pigmento predominante responsável pela coloração marrom das diatomáceas, encontra-se associada às clorofilas (*a* e *c*) formando um complexo proteico conhecido como fucoxantina-clorofila *a/c* (FCP) (GELZINIS *et al.*, 2015). Esse complexo está localizado nas membranas tilacoides do cloroplasto, onde ocorre a fase fotoquímica da fotossíntese, desempenhando um papel crucial na captação de luz (Fig. 5) (NIKOLAOU *et al.*, 2016). Os pigmentos fotossintetizantes captam a luz que se encontra na faixa PAR e a convertem em energia química, a qual é utilizada para fixar o CO₂ e produzir biomassa (LEPETIT *et al.*, 2017). Entretanto, a exposição à UVR pode ter implicações

significativas na fotossíntese e no desempenho das diatomáceas, uma vez que os processos de fotoinibição e fotoproteção podem ser afetados (COSTA *et al.*, 2012; VALLE *et al.*, 2014).

Figura 5. Localização dos pigmentos fotossintéticos presentes no FCP.



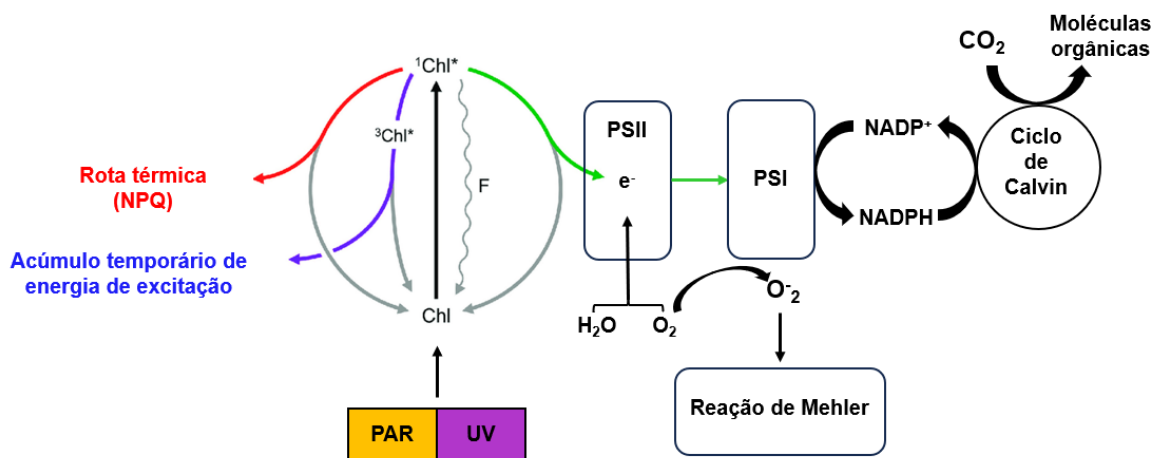
Fonte: Kuczynska *et al.* (2015).

A energia luminosa absorvida provoca a excitação da clorofila, passando do estado fundamental (Chl) para o estado excitado (Chl*) no complexo antena (Fig. 6) e pode retornar ao estado original a partir de alguns caminhos diferentes. Dentre esses caminhos, a dissipação fotoquímica (reações químicas) é um mecanismo que redireciona a energia luminosa absorvida para processos fotoquímicos não relacionados à fotossíntese, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEPETIT *et al.*, 2022). Este tipo de dissipação é geralmente considerado um processo indesejado na fotossíntese, pois representa uma perda de energia luminosa que poderia ser utilizada na síntese de compostos orgânicos e ocorre quando a capacidade e assimilação do CO₂ está limitada (CESSNA *et al.*, 2010).

A energia também pode ser dissipada em forma de calor (dissipação não-fotoquímica, NPQ), por um mecanismo de proteção essencial realizado pelos carotenoides envolvidos no ciclo das xantofilas, pois ajuda a evitar danos foto-oxidativos causados pelo excesso de luz (fotoinibição) (LEPETIT *et al.*, 2017; BRODDRICK *et al.*, 2019). Desta maneira, a quantidade

de energia luminosa é reduzida pelo complexo de captação de luz e assegura que haja energia suficiente para conduzir as reações fotoquímicas necessárias no processo de assimilação de CO_2 (WAGNER *et al.* 2016). Essas mudanças podem ser identificadas por meio de alterações na medição de alguns parâmetros de fluorescência da clorofila-*a*. A fluorescência (*F*) é o resultado do processo de re-emissão de energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila durante a fotossíntese (MASOJÍDEK *et al.*, 2013). Alguns parâmetros de fluorescência podem ser calculados, incluindo o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), o qual representa a eficiência máxima da fotossíntese e pode ser utilizado como indicador de fotoinibição; o rendimento quântico efetivo do PSII (Y_{II}), que fornece informações sobre a eficiência sobre a captação de luz, sendo utilizado como indicador de aclimatação às condições ambientais; e a taxa de transporte de elétrons (ETR), que está relacionada com a capacidade fotossintetizante (MALAPASCUA *et al.* 2014).

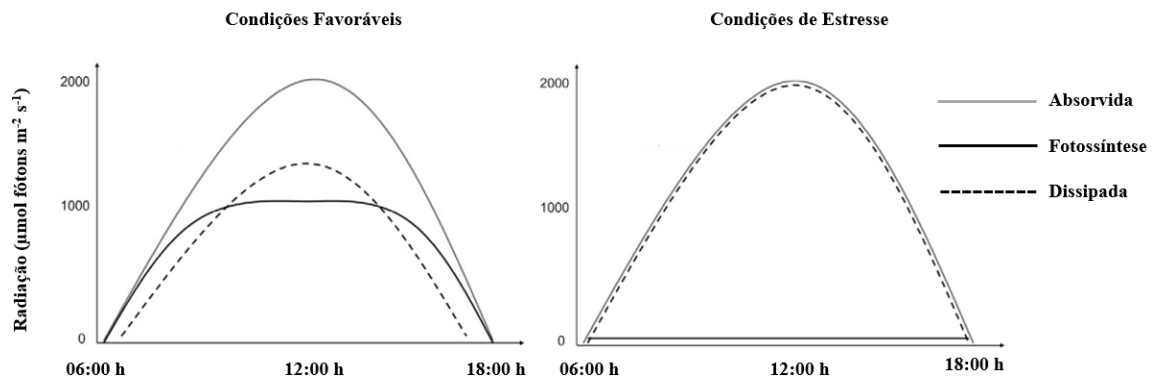
Figura 6. Esquema gráfico da absorção de luz durante a excitação da clorofila no complexo antena.



Fonte: adaptado de Cessna *et al.* (2010).

Durante as variações de energia luminosa (Fig. 7), as diatomáceas buscam equilibrar a absorção de energia da radiação com a proteção contra danos foto-oxidativos. Embora se tenha consciência dos efeitos adversos do estresse luminoso nas trocas gasosas, teor de clorofila, ultraestrutura dos cloroplastos e atividade enzimática, a resposta do aparato fotossintético a esse tipo de estresse ainda requer estudos mais aprofundados (LEPETIT *et al.*, 2022).

Figura 7. Esquema gráfico do efeito da radiação solar absorvida para fotossíntese ou dissipada.



Fonte: adaptado de Cessna *et al.* (2010).

1.5 FOTOINIBIÇÃO E FOTOPROTEÇÃO

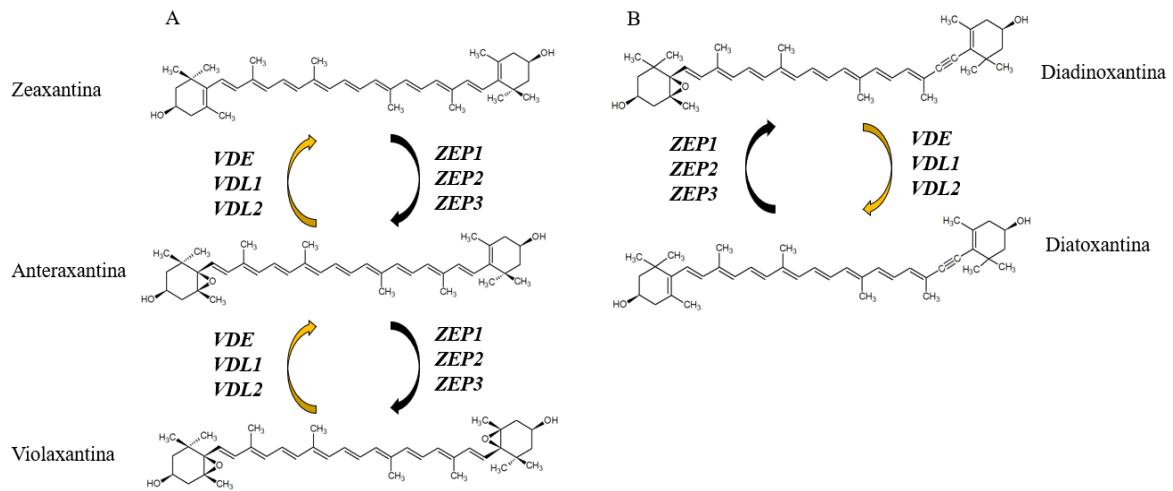
A fotoinibição e a fotoproteção são dois processos relacionados à resposta de organismos fotossintéticos às condições de luz variáveis. Esses processos têm efeitos opostos e desempenham papéis importantes na adaptação e sobrevivência das microalgas em diferentes condições luminosas (MASOJÍDEK *et al.*, 2013).

A fotoinibição ocorre quando há exposição das microalgas à irradiâncias muito altas. Neste caso, a luz intensa pode causar danos aos centros de reação P₆₈₀ e P₇₀₀ (Fotossistema II e Fotossistema I, respectivamente), levando à sua inativação ou na redução da eficiência fotossintética e na produção de oxigênio, o que pode prejudicar o crescimento e a sobrevivência das microalgas (FISHER *et al.*, 2020).

A fotoproteção é a resposta das microalgas para evitar ou minimizar os danos causados por este excesso de energia. Uma das estratégias mais comuns nesse processo, envolve o NPQ, que é o mecanismo de dissipação de energia na qual o excesso é convertido em calor e que está associado ao estado de de-epoxidação dos carotenoides envolvidos no ciclo das xantofilas e ajuda a proteger os centros de reação contra potenciais danos (LOHR; WILHELM, 2001). Além disso, a produção de substâncias antioxidantes também desempenha um papel fundamental na neutralização dos radicais livres gerados pela luz excessiva (CHALLABATHUL *et al.*, 2018).

Na microalga *P. tricornutum*, foram identificados dois tipos de ciclo de xantofilas: o ciclo da violaxantina-zeaxantina (VAZ, Fig. 8A) e o ciclo da diadinoxantina-diatoxantina (Ddx-Dtx, Fig. 8B) (KUCZYNSKA *et al.*, 2015), sendo este último o mais eficiente em termos de dissipação de energia em diatomáceas (LOHR; WILHELM, 1999, PAJOT *et al.*, 2023).

Figura 8. Ciclos VAZ (A) e Ddx-Dtx (B) em *P. tricornutum*.



Fonte: adaptado de Kuczynska *et al.* (2015).

Quando o ciclo Ddx-Dtx é ativado, as diatomáceas reduzem o número de centros de reação abertos no PSII, limitando a absorção de energia luminosa e reduzindo o risco de fotoinibição (KUCZYNSKA *et al.*, 2020; SEYDOUX *et al.*, 2022). Em condições de alta irradiância, a diadinoxantina (Ddx) é convertida em diatoxantina (Dtx) pelas isoformas da enzima violaxantina de-epoxidase (VDL, VDL1 e VDL2) e caso haja baixa iluminação ou ausência de luz, ocorre a reação inversa, onde a Dtx é convertida em Ddx através das isoformas da enzima zeaxantina epoxidase (ZEP1, ZEP2 e ZEP3). Desta maneira, as moléculas de Dtx e Ddx se ligam às proteínas de captação de luz (FCP), sendo precursores da fucoxantina (Fx) (CELLA *et al.*, 2023).

Embora o ciclo das xantofilas responda principalmente à PAR, a Dtx pode oferecer alguma proteção contra a UVR. Isso ocorre porque esse pigmento é capaz de absorver e dissipar parte da radiação que é prejudicial, reduzindo seu impacto nas células (ANDREASSON; WÄNGBERG, 2007). As diatomáceas frequentemente empregam múltiplos mecanismos de fotoproteção simultaneamente, além do ciclo das xantofilas, elas podem produzir outros pigmentos que absorvem UVR e enzimas que reparam danos no DNA. Esses mecanismos funcionam em conjunto para fornecer uma defesa abrangente contra a UVR e outras formas de radiação de alta energia (HALAC *et al.*, 2009). A resposta do ciclo das xantofilas em diatomáceas também pode depender do contexto ambiental. Em alguns casos, o aumento da UVR pode estar correlacionado com condições de alta luminosidade, semelhantes à PAR. Nessas condições, *P. tricornutum* pode ativar o ciclo das xantofilas para se proteger tanto do excesso de UVR quanto de PAR (SHI *et al.*, 2017).

1.6 JUSTIFICATIVA

Os efeitos da PAR e UVR descritos anteriormente, além de ocorrerem em condições naturais, também têm sérias consequências em se tratando dos cultivos de microalgas e dos diversos sistemas aplicados para essa finalidade, incluindo os cultivos sob condições de iluminação *in natura* e aqueles sob iluminação artificial. Diferentes condições de luz podem induzir estresse em diatomáceas, levando à produção de compostos específicos, muitos deles de interesse industrial. Compreender como a intensidade luminosa e o fotoperíodo afetam essas respostas ao estresse pode auxiliar na produção desses compostos.

Neste caso, a Lei de Reciprocidade de Bunsen-Roscoe (BUNSEN; ROSCOE, 1859) por exemplo, é uma relação fundamental na fotobiologia que relaciona a taxa fotossintética com o fotoperíodo e a intensidade luminosa. Essa lei é importante para entender como as condições de luz afetam o crescimento e a produtividade das microalgas em cultivos aquáticos, uma vez que, estabelece que a taxa de fotossíntese é proporcional ao produto da intensidade luminosa e do fotoperíodo. Isso significa que, se a intensidade luminosa aumentar, o tempo de exposição necessário para atingir a mesma quantidade de energia luminosa específica pode ser reduzido e vice-versa, desde que o produto da intensidade e do tempo permaneça constante.

Aplicando esta lei às culturas de *Phaeodactylum tricornutum*, que é reconhecida como um organismo-modelo para estudos fisiológicos e moleculares, pode-se alcançar a uma compreensão mais aprofundada de como regimes de luz contínua *versus* luz semicontínua afetam o crescimento e o metabolismo das diatomáceas. Desta maneira, se justifica um estudo com abordagens integradas, a fim de se conhecer melhor em como as doses de energia luminosa podem influenciar a regulação da fotoproteção e produção de fucoxantina, quando associadas às radiações PAR e UVR.

Objetivo Geral

Avaliar se a fotoproteção em *Phaeodactylum tricornutum* está vinculada às doses de energia luminosa ou à irradiância.

Objetivos Específicos

1. Determinar o efeito de diferentes fotoperíodos (12:12 e 24:00 h) com a mesma dose de energia luminosa (PAR) no mecanismo de fotoproteção e na produção de fucoxantina pela microalga *P. tricornutum*.
2. Quantificar aspectos relacionados com a fotoproteção (mecanismos fisiológicos e moleculares) de *P. tricornutum* com relação a tratamentos com radiação ultravioleta (PAR+UVA+UVB) e sem radiação UV (PAR), quando cultivada sob diferentes doses de energia luminosa.
3. Correlacionar a concentração de fucoxantina na microalga *Phaeodactylum tricornutum* com o fotoperíodo, a quantidade de energia luminosa e as radiações PAR e UVR.

CAPÍTULO 2

PAR REGULATION OF PHOTOPROTECTION IN *Phaeodactylum tricornutum* (BACILLARIOPHYCEAE): ROLES OF DOSES AND IRRADIANCES

Herculano Cella ^{a*}, Camila Nader ^a, Camila Lisarb Velasquez Bastolla ^b, José Bonomi-Barufi ^c, Carlos Yure B. Oliveira ^c, Rafael Garcia Lopes ^a, Jacó Joaquim Mattos ^b, Cláudia Marlene Bauer ^d, Marcelo Maraschin ^d, Leonardo Rubi Rörig ^c, Afonso Celso Dias Bainy ^b, Maria Risoleta Freire Marques ^b, Roberto Bianchini Derner ^a

^a Laboratory of Algae Cultivation, Department of Aquaculture, Center of Agrarian Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^b Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^c Laboratory of Phycology, Department of Botany, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^d Laboratory of Plant Morphogenesis and Biochemistry, Center of Agrarian Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: hercu.ufsc@yahoo.com.br. Address: Beco dos Coroas, 503, 88061-600, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Phone number: +554899919-4867.

ORCID: 0000-0003-2558-7242

Artigo publicado na revista **Journal of Applied Phycology** (Percentil 90% = QUALIS A1)

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03042-8>

O artigo está formatado de acordo com as normas da revista.

Abstract

Photosynthetic diatoms are exposed to a rapid and unexpected variations in light intensity that can modulate the contents of photosynthetic pigments and the carotenoid profile. In this study, the influence of light availability on photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* was investigated. Experimental cultures were exposed to three irradiances (100, 200 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and two light: dark cycles (12:12 and 24:00 h) that resulted in different light energy daily doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$), where the treatments were named in $\text{ND}_{x\text{h}}$ (N = amount of daily doses D , and x = photoperiod in hours). The different doses were compared in terms of cell growth, chlorophyll-*a* fluorescence, pigment content and gene transcription levels. Specific growth rate was 1.9-fold higher in $8D_{24\text{h}}$ daily dose ($34.56 \text{ mol photons m}^{-2}$) with 3 times higher light absorption in comparison to the lowest light energy dose. Also, at higher light intensities the content of chlorophyll-*a*, fucoxanthin and diadinoxanthin was lower, while the regulation of the xanthophyll cycle was achieved by the highest light energy doses. The transcriptional profiles of *ZEP1*, *ZEP2*, *VDL1* and *VDL2* genes were influenced by the highest light energy doses, on the other hand *VDE* and *ZEP3* genes were poorly regulated by light. In addition, a similar transcription pattern was found for two isoforms of *ZEP* genes as well as in *VDL* genes. This study demonstrated that light energy doses and irradiances affect the photoacclimation and photoprotection responses.

Keywords: Diatom; Gene transcript level; High light stress; Non-photochemical quenching; Photosynthesis.

2.1 INTRODUCTION

Diatoms are photosynthetic microorganisms found in many environments, and account for up to 40% of global primary productivity (Serôdio and Lavaud, 2020). They are a major group within chromalveolate algae and their cell walls are predominantly composed of silica that, together with other nutrients, are important for photosynthetic efficiency (Brodrick et al. 2019). Moreover, they are a natural source of many compounds, including a variety of pigments, such as chlorophylls and carotenoids, which have specific functions in cellular metabolism and have attracted biotechnological interest in recent years (Sharma et al. 2021).

Diatoms have eight main types of carotenoids which can be classified into two groups: carotenes, e.g., β -carotene (β -car); and xanthophylls, represented by zeaxanthin (Zx), antheraxanthin (Ax), violaxanthin (Vx), neoxanthin (Nx), diadinoxanthin (Ddx), diatoxanthin (Dtx) and fucoxanthin (Fx) (Kuczynska et al. 2015; Bauer et al. 2019). The marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* has been recognized as a model organism for physiological and molecular studies, mainly due to being one of the first microalgae to have its genome sequenced (Bowler et al. 2008; Nymark et al. 2013; Falciatore et al. 2020). This microalga is also an interesting candidate for carotenoid commercial production, particularly Fx, that has nutraceutical properties and can be used against a variety of inflammation and cancer-related diseases (Liu et al. 2016; Andrade et al. 2018; Lopes et al. 2020). Fucoxanthin biosynthesis in *P. tricorutum* was described by Lohr and Wilhelm (2001) to occur from lycopene (a precursor of carotenoids) via hydroxylation and epoxidation reactions, and two alternative routes of xanthophylls production were described. In the first pathway, Vx acts as a precursor of Ddx and Fx, while in the second pathway, Dambek et al. (2012) suggest that Vx leads to Nx, Ddx and Fx synthesis. Regarding this second alternative pathway, Dautermann et al. (2020) proposed a new hypothesis of carotenoid biosynthesis in chromalveolate algae that shows Vx as a precursor of lutoxanthin and Nx, while Nx leads to Ddx and dinoxanthin, being both a putative intermediate in the Fx biosynthesis. Despite the sequencing of the genomes of *Thalassiosira pseudonana* by Armbrust et al. (2004) and *P. tricorutum* by Bowler et al. (2008), some unknown enzymes need to be identified in order to understand even more this metabolic pathway (Bauer et al. 2019).

The regulation of this biosynthetic pathway is influenced by the photosynthetically active radiation (PAR), causing diatoms to alter their content of photosynthetic pigments like chlorophylls and carotenoid profile, as they respond to changes in light intensity and light energy doses (Falciatore et al. 2020). Diatoms have a light-harvesting complex called fucoxanthin-chlorophyll *a/c*-binding antenna protein (FCP) which contains chlorophyll-*c* (Chl-

c) as accessory of chlorophyll-*a* (Chl-*a*) and Fx as the major carotenoid (Gelzinis et al. 2015). This complex is homologous to light-harvesting complex II (LHCII) of vascular plants, performing similar roles (Büchel et al. 2022). In fact, diatoms have evolved various mechanisms and strategies such as changes in pigmentation, in order to enhance photosynthetic responses and growth rate (Ragni and d'Alcalà 2007; Lepetit et al. 2017; Conceição et al. 2020). An important regulatory mechanism in photosynthesis is the cyclic electron transport around Photosystem II (PSII) which can dissipate the excessively absorbed light energy under high illumination (Wagner et al. 2016).

According to Lohr and Wilhelm (2001), two xanthophyll cycles are found in *P. tricornutum*, violaxanthin cycle (Vx-Ax-Zx) and diadinoxanthin cycle (Ddx-Dtx). In both cycles, three epoxidation reactions are catalyzed by zeaxanthin epoxidase enzymes (ZEP1, ZEP2 and ZEP3) under low irradiance/dark conditions, as well as three reverse de-epoxidation reactions are catalyzed by violaxanthin de-epoxidase enzymes (VDE, VDL1 and VDL2) at higher irradiance. However, the Ddx-Dtx cycle is considered more efficient in diatoms, since the de-epoxidation rate can reach 4-fold higher than that of the violaxanthin cycle (Lohr and Wilhelm 2001). In addition, similarity research of the de-epoxidation was found in two clonal strain of the haptophyte *Tisochrysis lutea* with a 10-fold higher rate of Ddx-Dtx cycle in comparison to violaxanthin cycle as reported by Pajot et al. (2023). One of the main functions of these carotenoids is to be involved in the photoprotection mechanism, which can quickly dissipate the excess energy through non-photochemical quenching (NPQ) that is linked to the de-epoxidation state of carotenoids involved in the xanthophyll cycle (Goss and Lepetit 2015). For instance, under high illumination, the synthesis of these pigments increases to protect the photosynthetic apparatus from a potential photo-oxidation damage (Lepetit et al. 2017; Broddrick et al. 2019). Due to the antioxidant activity of these xanthophylls, cells are shielded from the damaging effects of free radicals and reactive oxygen species (ROS). This protection not only preserves cellular integrity but also enhances the equilibrium and efficiency of the photosynthetic apparatus (Lepetit et al. 2010).

The conclusion of *P. tricornutum* genome sequencing led to the proposal of new strategies in order to provide a more in-depth understanding of some factors that regulate important cellular processes in diatoms (Bowler et al. 2008). It is important to emphasize that the regulation of gene transcription also depends on certain culture conditions, however, the mechanisms behind this physiological plasticity are not well understood (Depauw et al. 2012; Kuczynska et al. 2015; Falciatore et al. 2020). Despite the different mechanisms evolved by photosynthetic organisms, a general rule in photochemistry is well-known, the Bunsen-Roscoe

reciprocity law claims that the extent of photochemical effects is directly proportional to the total energy dose by cumulative irradiance regardless of the type of illumination regime administered (Bunsen and Roscoe 1859). This law has not been described in the diatom *P. tricornutum*, which is important for understanding the mechanisms of photoprotection and photoacclimation to changing light environments in marine phytoplankton. Thus, the aim of this study was to analyze whether the photoprotection of *P. tricornutum* is linked to light energy doses or radiation intensity.

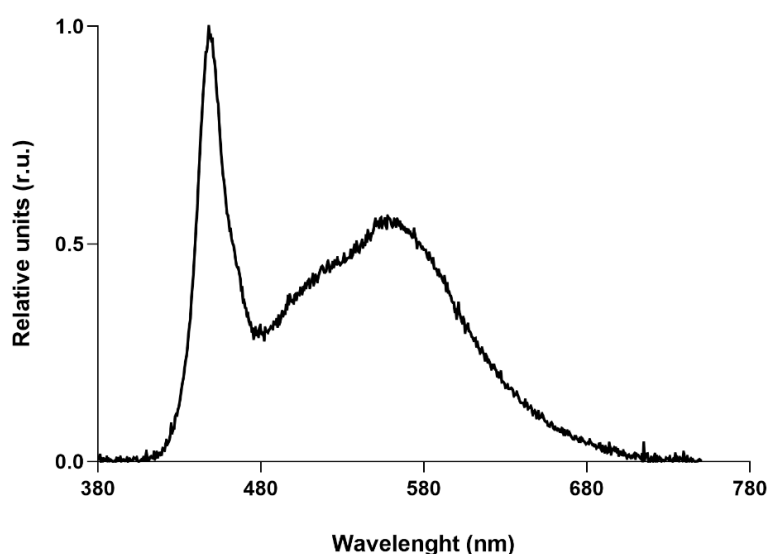
2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Culture conditions

The diatom *Phaeodactylum tricornutum* strain CCAP1055/1 was maintained in the Laboratory of Algae Cultivation (LCA) at the Federal University of Santa Catarina – Brazil.

Before starting experimental assay, we focused to determine what would be irradiances to be applied. Cultures were exposed to increasing levels of irradiance (0, 25, 50, 100, 150, 600 and 1200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and these values were obtained by placing the diatom vessels in different distances from a LED-light source (Taschibra 70W TL Slim) at 21 ± 1 °C. In addition, this light source spectrum (Fig. 1) was measured with a spectroradiometer (Avantes Starline, AvaSpec-2048).

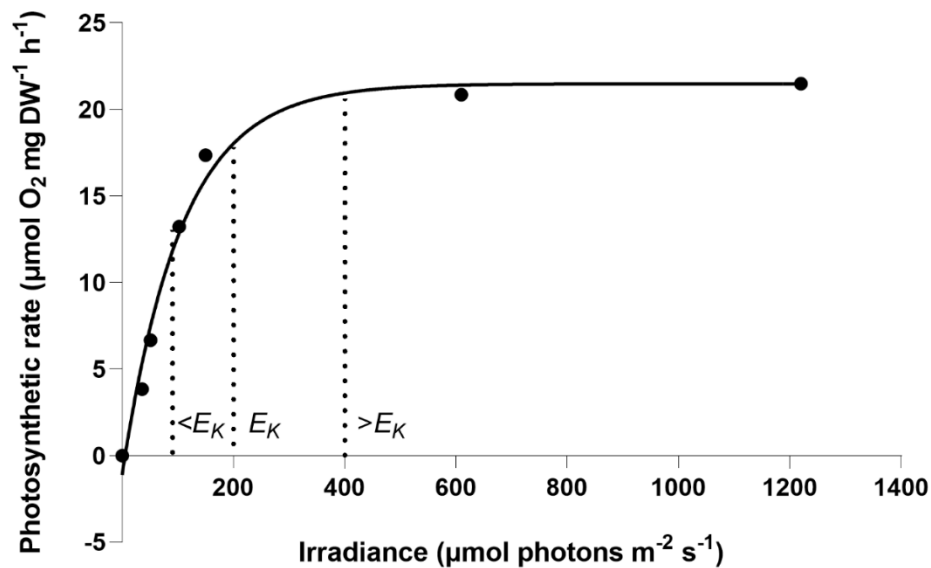
Figure 1. LED-light source spectrum used in the experimental procedures.



In each case, the irradiances were measured by a quantummeter (LI-250A, LI-COR). Samples were incubated in triplicate during 1 h and oxygen concentrations were measured in

the water before and just after the incubation procedure with an oximeter (YSI, Model ProODO). From the photosynthesis-irradiance (P-I) curve (Fig. 2) of *P. tricorruptum*, one non-saturating irradiance ($<E_K = 100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), one irradiance at onset of saturation ($E_K = 200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and one saturated irradiance ($>E_K = 400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were determined.

Figure 2. Photosynthesis-irradiance response curve.



$<E_K$ = non-saturated irradiance, E_K = onset of saturation irradiance and $>E_K$ = higher than saturated irradiance.

Prior to the beginning of the experimental period, cultures of all treatments were acclimated for 7 d and maintained in a concentration of 70 mg of algal biomass per L, by daily dilution every 24 h to minimize self-shading effects. The assay was carried out in 2 L borosilicate flasks in LCA-AM medium (Sales et al. 2019), under constant agitation by bubbling with atmospheric air with an addition of 0.5% of CO_2 (v/v) and at $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. The experiment was conducted combining three irradiances with two photoperiods, resulting different light energy doses: irradiance \times light: dark (L:D) cycle, totaling six treatments as summarized in triplicate (Table 1). Culture samples were collected at different time intervals (T0, T24, T48 and T72, representing 0, 24, 48 and 72 h after starting the experiment) to evaluate growth, and for the measurements of chlorophyll-*a* fluorescence in PSII, pigment content and qPCR analysis in *P. tricorruptum*.

Table 1. Treatments applied to *Phaeodactylum tricornutum* cultures based on the light energy doses (irradiance × L:D cycle).

Treatments	Irradiance ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	L:D cycle	Dose ($\text{mol photons m}^{-2}$)
D _{12h}	100	12:12 h	4.32
2D _{12h}	200	12:12 h	8.64
4D _{12h}	400	12:12 h	17.28
2D _{24h}	100	24:00 h	8.64
4D _{24h}	200	24:00 h	17.28
8D _{24h}	400	24:00 h	34.56

2.2.2 Growth evaluation and light absorption

Previously to the experiment, we conducted measurements of turbidity (NTU) with a turbidimeter (HI 93703 Hanna, at 890 nm) and dry biomass by gravimetric method using glass fiber microfilters (APHA, 2011) (mg L^{-1}). These measurements were used to follow the growth rates of *P. tricornutum*. Then, we took samples with different algal concentration and associated the data of turbidity with algal biomass (regression analysis) in each sample according to equation 1 ($R^2 = 0,99$):

$$\text{Biomass (mg L}^{-1}\text{)} = \text{ABS}_{890} \times 2.20 + 0.01 \quad (1)$$

Before the experimental procedures, these data were used to calculate the specific growth rate (μ , d^{-1}) according to equation 2, as proposed by Ye et al. (2018):

$$\mu = \frac{\ln(X_f : X_i)}{\Delta t} \quad (2)$$

Where X_f and X_i were biomass concentrations at the period “ Δt ” (d).

The light attenuation measurements were performed in the center of 2 L borosilicate flasks containing *P. tricornutum* cells in suspension at a horizontal depth of 6.8 cm. Irradiance data were collected inside the vessel for each treatment with the aid of a quantummeter (LI-250A, LI-COR) and the light attenuation coefficient (k , m^{-1}) was calculated according to equation 3, as proposed by Krause-Jensen and Sand-Jensen (1998):

$$I_z = I_0 e^{-kz} \quad (3)$$

Where I_z = irradiance at depth ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); I_0 = irradiance emitted by the LED ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) at the level of the medium surface and z = horizontal depth of 2 L borosilicate flasks (m).

After this step, the light attenuation coefficient of T0 was normalized by the time intervals T24, T48 and T72 to determine how much light was attenuated in 24 h. The new value

of light attenuation (AT) was used to calculate the light absorption (AB) according to equation 4:

$$AB (\%) = (1 - AT) \times 100 \quad (4)$$

2.2.3 Chlorophyll-*a* fluorescence measurements

The photosynthetic parameters were measured by pulse amplitude modulation fluorescence (WATER-PAM - Heinz Walz GmbH, 2000) according to Malapascua et al. (2014) (Table 2).

Table 2. Photosynthetic parameters calculated from fluorescence measurements.

Measurements	Symbols	Formulae
Effective quantum yield of PSII	Y_{II} or $\Delta F/F_m'$	$Y_{II} = (F_m' - F) / F_m'$
Maximum photochemical quantum yield of PSII	F_v/F_m	$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$
Electron transport rate ($\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	ETR	$ETR = Y_{II} \times E_{PAR} \times \text{ABSt} \times F_{II}$
Non-photochemical quenching	NPQ	$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$

F_o , F_v and F_m = minimum, variable and maximum fluorescence in the dark-acclimated condition. F and F_m' = steady-state and maximum fluorescence in the light-acclimated state. E_{PAR} = irradiance levels according to Table 1. ABSt = absorptance. F_{II} = fraction of total chlorophyll-*a* in PSII.

During the acclimation, minimum (F_o) and maximum (F_m) fluorescence levels were measured after dark acclimation for 10 min to calculate the maximum photochemical quantum yield of PSII (F_v/F_m), while stable (F) and maximum (F_m') fluorescence were measured after light acclimation at the experimental irradiances (without any actinic light from the PAM) for 10 min to provide a saturating pulse and then obtain fluorescence values to calculate the effective quantum yield of PSII (Y_{II}). Fluorescence measurements were collected at 1-hour intervals to determine the maximum yields and, after seven days, when the Y_{II} remained constant, the experiment began, as this indicates the acclimatization of *P. tricornutum* cells. To allow a proper estimation of ETR, it is necessary to take into account only the ratio of chlorophylls associated to each photosystem, and in this case, these ratios were determined previously by Johnsen and Sakshaug (2007) considering different algal species containing diverse pigmentary composition. In this way, the fraction of cellular chlorophyll-*a* in PSII (F_{II})

of *P. tricornutum* acclimated to low light and high light were provided by these authors. The absorbance (ABSt) can be estimated from the transmittance values (T) as proposed by Enríquez and Borowitzka (2010) according to equation 5, based on the attenuation coefficient calculations.

$$ABS_t = 1 - T \quad (5)$$

2.2.4 Determination of chlorophyll concentrations and pigment analysis

For each sample, 5 mL was filtered through a 0.45 µm glass fiber filter and stored at -20 °C for further analysis. The photosynthetic pigments Chl-*a* and Chl-*c* were extracted as in Strickland and Parsons (1972) and quantified according to Jeffrey and Humphrey (1975) using a UV-Vis spectrophotometer (Genesys 10 vis, Thermo). The content of both pigments was reported as mg g⁻¹ biomass dry weight (DW).

Ddx, Dtx, and Fx were quantified using a high-performance liquid chromatography (HPLC) of *P. tricornutum* extracts. An aliquot of each sample (10 µL, n = 3) was injected into a liquid chromatograph (Shimadzu LC-10 A) and the metabolite quantification was performed according to Schmitz et al. (2022). The readings were taken in triplicate and the results were reported in mg g⁻¹ DW. The de-epoxidation state (DES, %) was calculated as described in Ruban et al. (2004) according to equation 6:

$$DES = \frac{Dtx}{Dtx + Ddx} \times 100 \quad (6)$$

Where, Dtx = diatoxanthin content (mg g⁻¹ DW) and Ddx = diadinoxanthin content (mg g⁻¹ DW).

2.2.4 RNA purification and cDNA synthesis

Culture samples were taken from each experimental unit according to Lopes et al. (2019). The culture was centrifuged (2950 x g, 5 min), washed 1x with sterile marine water, and the pellets were immediately frozen and stored at -80 °C. Total RNA was purified from 5 mg biomass using 1 mL of Qiazol Lysis Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions to the final volume of 20 µL. The RNA concentration was estimated at 260 nm, with purity checked at ratios of 260/280 (>1.8) and 260/230, on a Nanodrop 1000 (Thermo).

Then, cDNA was synthesized with the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Prior to reverse transcription, 1 µg of total RNA was treated with the provided gDNA wipeout buffer for 2 min at 42 °C to eliminate gDNA

contamination. The cDNA concentration and purity were then checked on a Nanodrop as previously described.

2.2.5 Quantitative real-time PCR analysis (qPCR)

Primers were designed using the OligoAnalyzer software (IDT, <http://www.idtdna.com>) based on sequences of mRNAs from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the resulting primer pairs are listed (Table 3).

Table 3. List of primers used for amplification of target genes-related to fucoxanthin biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.

Gene	Primer sequence 5' - 3'	Amplicon size (pb)	NCBI Reference Sequence
<i>ZEP1</i>	F - GCTGGAGCAAGGGACAAGTT	96	XM_002180202.1
	R - AGCCATCTTCGGTAGCCTGA		
<i>ZEP2</i>	F - ACAAGGAAGGTGGTGTCAAATC	97	XM_002176899.1
	R - AGGATTGTTTCTCCCGCAAAG		
<i>ZEP3</i>	F - TGGTTGGAAGAACGACAAG	93	XM_002178331.1
	R - AGCTCAAATAGGACCAGAGA		
<i>VDE</i>	F - TCCATCGTTTCGTGTCTCTTCC	109	XM_002178607.1
	R - GTCGTCCCGTACAGGTGTTAAT		
<i>VDL1</i>	F - GAGTGACAAGGAACTCGATATG	100	XM_002180599.1
	R - GATCATGTGTTTCGGTGAGAG		
<i>VDL2</i>	F - GCTACGCATGGATGTGGAAT	101	XM_002180015.1
	R - CTTCGCCGCTGACAAGAAT		

Transcription levels of selected genes were analyzed by qPCR using the QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen). Real-time reactions were performed from 100 ng cDNA and 1 μ M of each primer per reaction and quantified using the Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen). The PCR product was analyzed and submitted to melting analyses as in Lopes et al. (2019). The efficiency of the reaction (E) was determined for each pair of primers and confirmed through the cDNA calibration curve from serial dilutions (1:2) with 800; 400; 200 and 100 ng (in duplicates) from a pool of all cDNA samples (90). All curves showed a correlation coefficient above 0.99 and efficiency between 95 and 105%. Normalization for each target gene was performed according to Rhinn et al. (2008), based in the cDNA concentrations in the samples. All data were calibrated by the mRNA levels of the control group (D_{12h}, n = 3) and the results were analyzed by the 2^{-C_q} method (Schmittgen and Livak 2008).

2.2.6 Statistical analysis

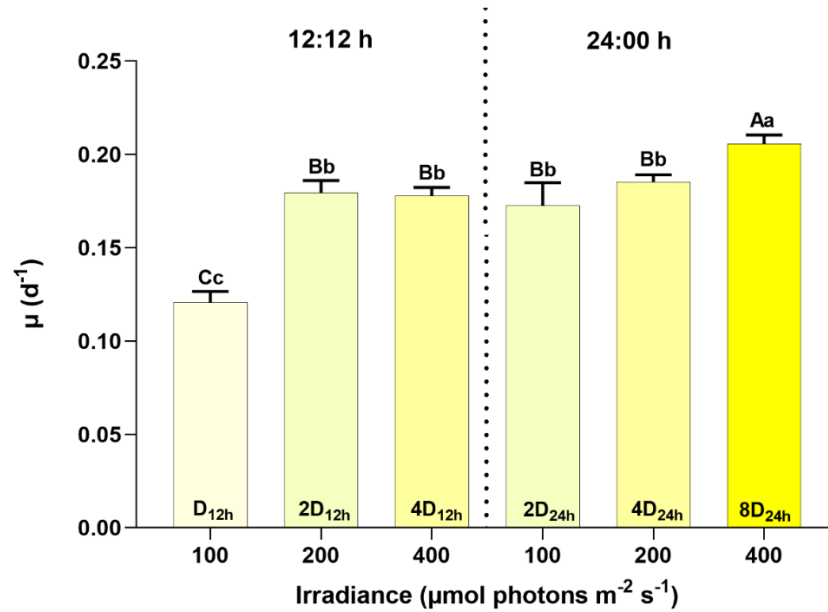
All data points are presented as the mean of each treatment ($n = 3$) plus the standard deviation (SD). Data normality and homoscedasticity were evaluated by the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. One-way ANOVA coupled with Tukey post hoc test was performed to study the significance between light energy doses (six levels) and also the isolated factor irradiance. Two-way ANOVA coupled with Tukey post hoc test was performed to study the interaction between the same irradiances (three levels) on both L:D cycles (two levels). Figures were generated using GraphPad Prism (version 9.0), and statistical analyses were conducted using Statistica software (version 7.0). Moreover, a Pearson correlation analysis (RStudio software - Version 3.1.1; <https://www.rstudio.com/>) was performed to determine the degree of correlation between growth, photosynthetic parameters, pigment content and gene transcript levels. For all analyses, a level of significance of 5% was adopted.

2.3 RESULTS

2.3.1 Growth performance

Phaeodactylum tricornutum cultures were diluted every 24 h and maintained in a biomass of 70 mg L^{-1} to minimize any self-shading effects. Fig. 3 shows the effect of different light energy doses on specific growth rate. The different treatments showed similar photophysiological conditions between the same light energy doses of $2D_{12h}/2D_{24h}$ and $4D_{12h}/4D_{24h}$ with a specific growth rate of 0.18 ± 0.01 and $0.19 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$, respectively. Also, a higher specific growth rate of $0.21 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ in $8D_{24h}$ dose was found as compared to D_{12h} dose ($0.12 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$). For the treatments that received the same irradiance on both L:D cycles, there was significant differences ($p < 0.05$) for the irradiances 100 and $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in 24:00 h L:D cycle, reaching a specific growth rate of 1.5- and 1.2-fold higher than 12:00 h L:D cycle, respectively.

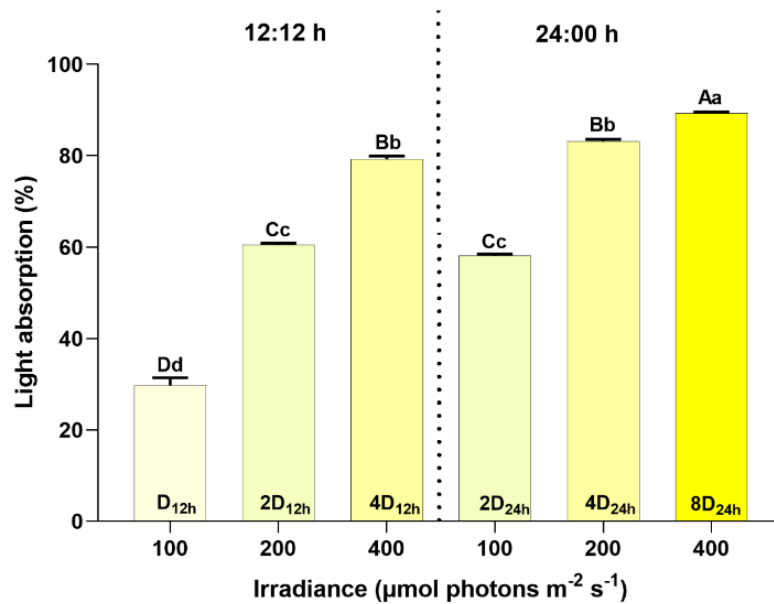
Figure 3. Specific growth rates in *Phaeodactylum tricornutum* cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$).



Each value is represented as mean \pm standard deviation of biological triplicates ($n = 3$). Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles obtained by two-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$). Different small letters represent the differences caused by the light energy doses obtained by one-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$).

Regarding light absorption by *P. tricornutum* cells (Fig. 4), about 90% of the light was absorbed by cultures exposed to the 8D_{24h} dose, while the treatment with a lower dose (D_{12h}) presents a limitation in the amount of energy within the culture system, reaching 30% absorption. Treatments with the same light energy doses of 2D_{12h}/2D_{24h} and 4D_{12h}/4D_{24h} showed light absorption rates of 60 and 80%, respectively. For the treatments that received the same irradiance on both L:D cycles, there were significant differences ($p < 0.05$) for the irradiances 100, 200 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 24:00 h L:D cycle, reaching a light absorption of 2-, 1.4- and 1.2-fold higher than 12:00 h L:D cycle, respectively.

Figure 4. Light absorption values in *Phaeodactylum tricornutum* cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$).



Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles. Different small letters represent the differences caused by the light energy doses. Each value is represented as mean \pm SD ($n = 3$) with significant differences ($p < 0.05$).

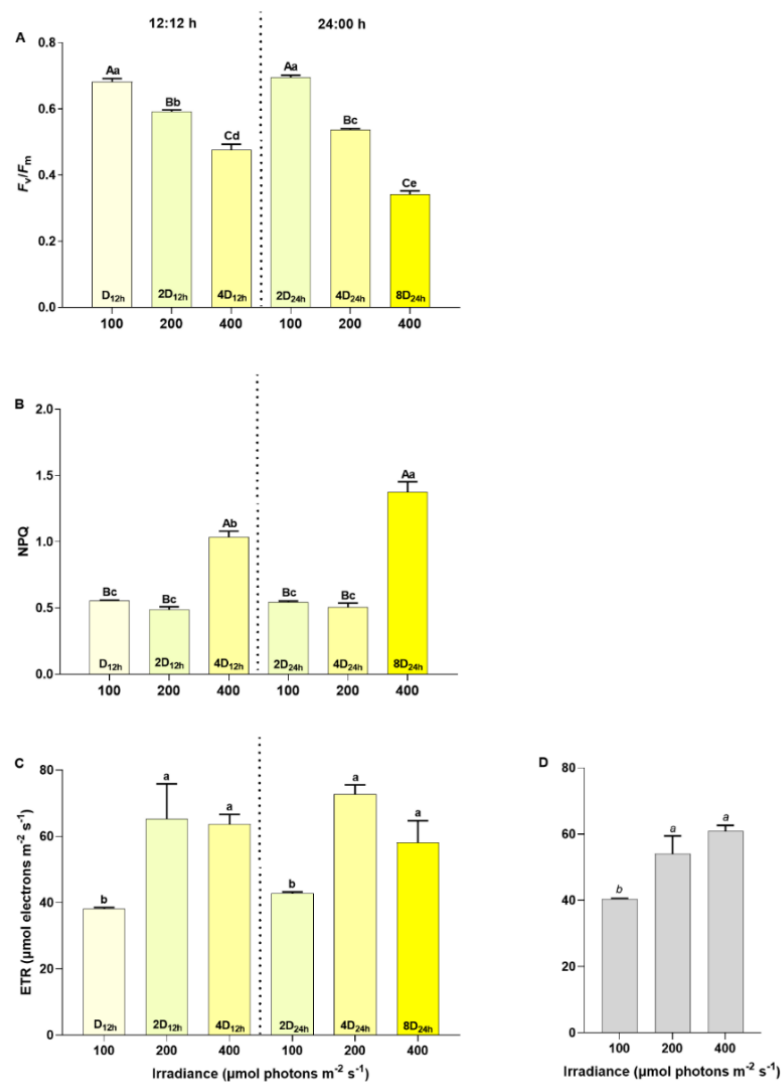
2.3.2 Chlorophyll-*a* fluorescence in PSII

As can be seen in Figure 5A, all treatments showed significant effects ($p < 0.05$) on the maximum quantum yield of PSII in *P. tricornutum*. The F_v/F_m of the photosynthetic apparatus decreased as the light intensity increased, in both L:D cycles. The cells treated with the 2D_{12h} and 4D_{12h} doses showed lower values (0.58 ± 0.04 and 0.45 ± 0.02) in relation to the same doses applied in the 24:00 h L:D cycle (0.69 ± 0.06 and 0.54 ± 0.04). However, the lowest F_v/F_m value (0.33 ± 0.01) was reported for cells exposed to the 8D_{24h} dose, while the dose D_{12h} presented 2-fold this quantum potential. For the treatments that received the same irradiance on both L:D cycles, there were no significant differences ($p < 0.05$) for the irradiances 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, while the irradiances of 200 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in 12:00 h L:D cycle were 1.1- and 1.4-fold higher than 24:00 h L:D cycle, respectively.

Regarding non-photochemical quenching (NPQ, Fig. 5B), the maximum values (1.05 ± 0.04 and 1.37 ± 0.08) were found in the 4D_{12h} and 8D_{24h} doses respectively, reaching a dissipation of 2- and 2.7-fold higher than in the lowest light energy doses on both L:D cycles. However, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the lowest irradiances, regardless of the irradiance of 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The electron transport rate (ETR, Fig. 5C and 5D) in *P. tricornutum* cultures, after receiving distinct light energy doses reached

maximum values of 70 and 60 $\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for the doses of 2D_{12h}/4D_{24h} and 4D_{12h}/8D_{24h}, respectively in 200 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Minimum values of 40 $\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were found for the irradiance of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, regardless of the L:D cycles and the doses applied. In cultures that received the same light energy dose, only the 2D_{12h} dose showed a significant difference ($p < 0.05$) with an ETR 1.5-fold higher in comparison to the 2D_{24h} treatment.

Figure 5. Chlorophyll-a fluorescence parameters as Fv/Fm (A), NPQ (B) and ETR (C and D) in *Phaeodactylum tricornutum* cells under different light energy doses (D = 4.32 mol photons m⁻²) and irradiances.

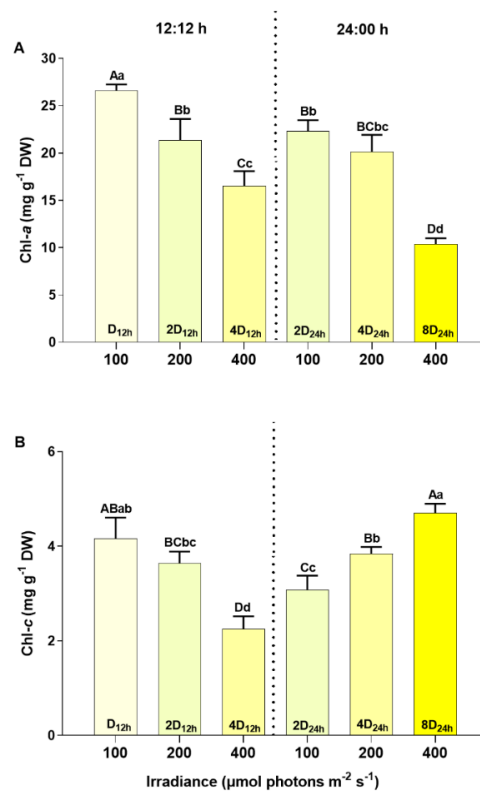


Each value is represented as mean \pm standard deviation of biological triplicates ($n = 3$). Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles obtained by two-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$). Different small letters represent the differences caused by the light energy doses and different italic letters represent the differences caused by the isolated factor irradiance, both obtained by one-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$).

2.3.3 Pigment content

Chlorophylls concentration in *P. tricorutum* cells changed significantly ($p < 0.05$) in all treatments, as shown in Figure 6. The content of Chl-*a* (Fig. 6A) increased significantly ($p < 0.05$) at irradiances of $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($26.63 \pm 0.61 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) and $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($21, 34 \pm 2.26 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), regardless of L:D cycles. However, the level of these pigment decreased with the irradiance of $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the dose of $4\text{D}_{12\text{h}}$ reaching values of $16.54 \pm 1.54 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$. The Chl-*a* content dropped even more in the $8\text{D}_{24\text{h}}$ treatment, presenting values of $10.37 \pm 0.62 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the irradiances of $2\text{D}_{12\text{h}}/2\text{D}_{24\text{h}}$ and $4\text{D}_{12\text{h}}/4\text{D}_{24\text{h}}$ doses. Chl-*c* content (Fig. 6B) was influenced by irradiance, since higher concentrations were found in $\text{D}_{12\text{h}}$, $2\text{D}_{12\text{h}}$ as well as in $4\text{D}_{24\text{h}}$ and $8\text{D}_{24\text{h}}$ doses, reaching values of $4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$.

Figure 6. Chl-*a* (A) and Chl-*c* (B) concentrations in *Phaeodactylum tricorutum* cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.

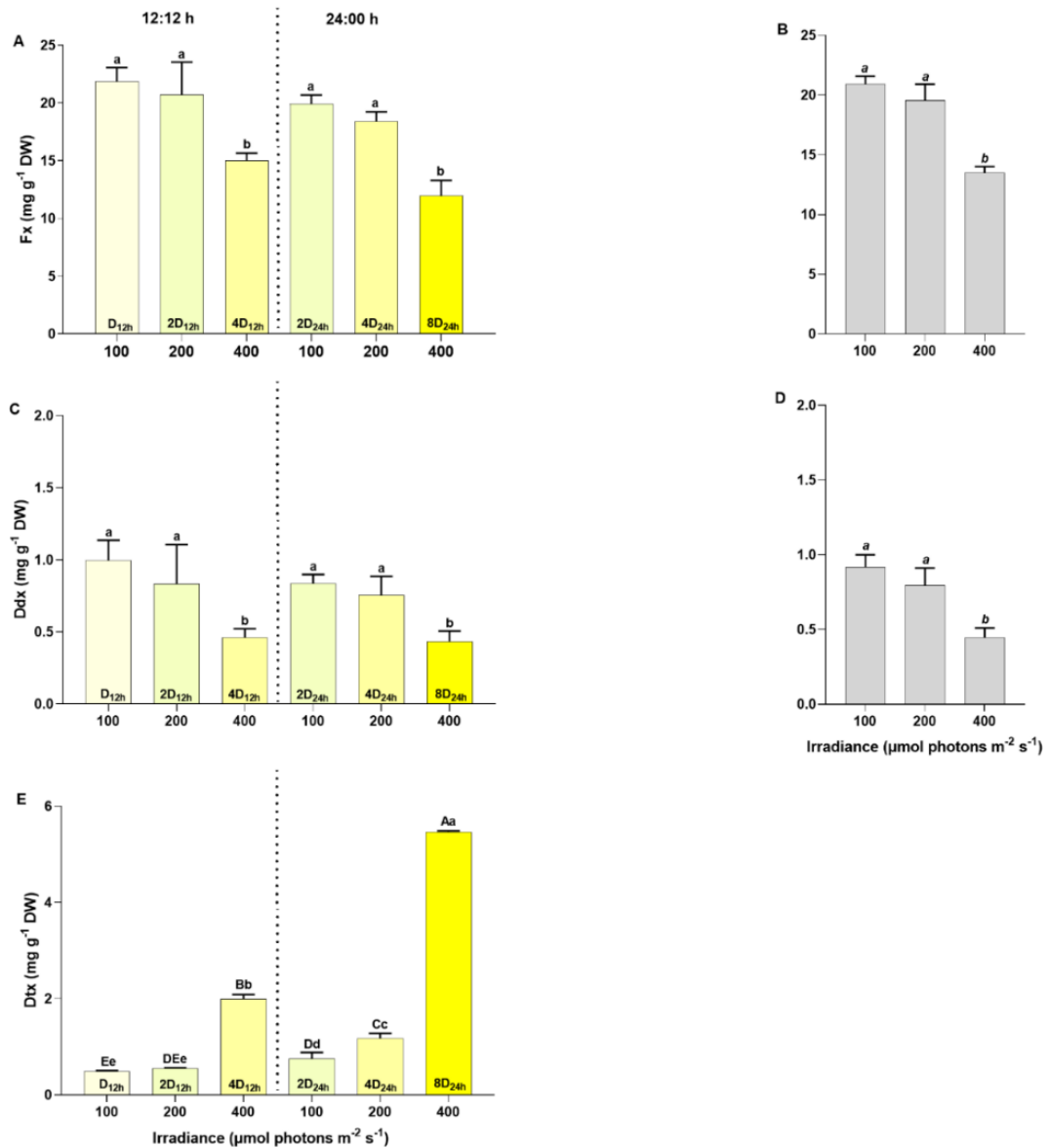


Each value is represented as mean \pm standard deviation of biological triplicates ($n = 3$). Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles obtained by two-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$). Different small letters represent the differences caused by the light energy doses obtained by one-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$).

In the case of Fx productivity (Fig. 7A and 7B), maximum concentrations were found at lowest light energy doses in both irradiances of 100 and 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, reaching values of 21.87 ± 1.2 , 20.72 ± 2.82 , 19.92 ± 0.77 and $18.40 \pm 0.83 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ in the doses of $D_{12\text{h}}$, $2D_{12\text{h}}$, $2D_{24\text{h}}$ and $4D_{24\text{h}}$, respectively. Moreover, the level of Fx decreased with the irradiance of 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the dose of $4D_{12\text{h}}$ and $8D_{24\text{h}}$ reaching values of 15.03 ± 0.64 and $11.95 \pm 1.34 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$, respectively.

Regarding Ddx (Fig. 7C and 7D) and Dtx (Fig. 7E), it is evident that these two xanthophylls have an inverse relationship with each other. The decrease in irradiance resulted in an increase in Ddx production at doses $D_{12\text{h}}$ ($0.90 \pm 0.14 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), $2D_{12\text{h}}$ ($0.81 \pm 0.29 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), $2D_{24\text{h}}$ ($0.83 \pm 0.27 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), and $4D_{24\text{h}}$ ($0.76 \pm 0.13 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), while the increase in irradiance reflected in a higher concentration of Dtx in the $4D_{12\text{h}}$ ($2.00 \pm 0.09 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) and $8D_{24\text{h}}$ ($5.46 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) doses. The accumulation of Dtx in the $8D_{24\text{h}}$ dose was approximately 12-fold higher than in the lowest irradiances suggesting a joint resulted of conversion Ddx to Dtx and the enhancement of the xanthophyll biosynthesis.

Figure 7. Fx (A and B), Ddx (C and D) and Dtx (E) concentrations in *Phaeodactylum tricornutum* cells under different light energy doses (D = 4.32 mol photons m⁻²) and irradiances.

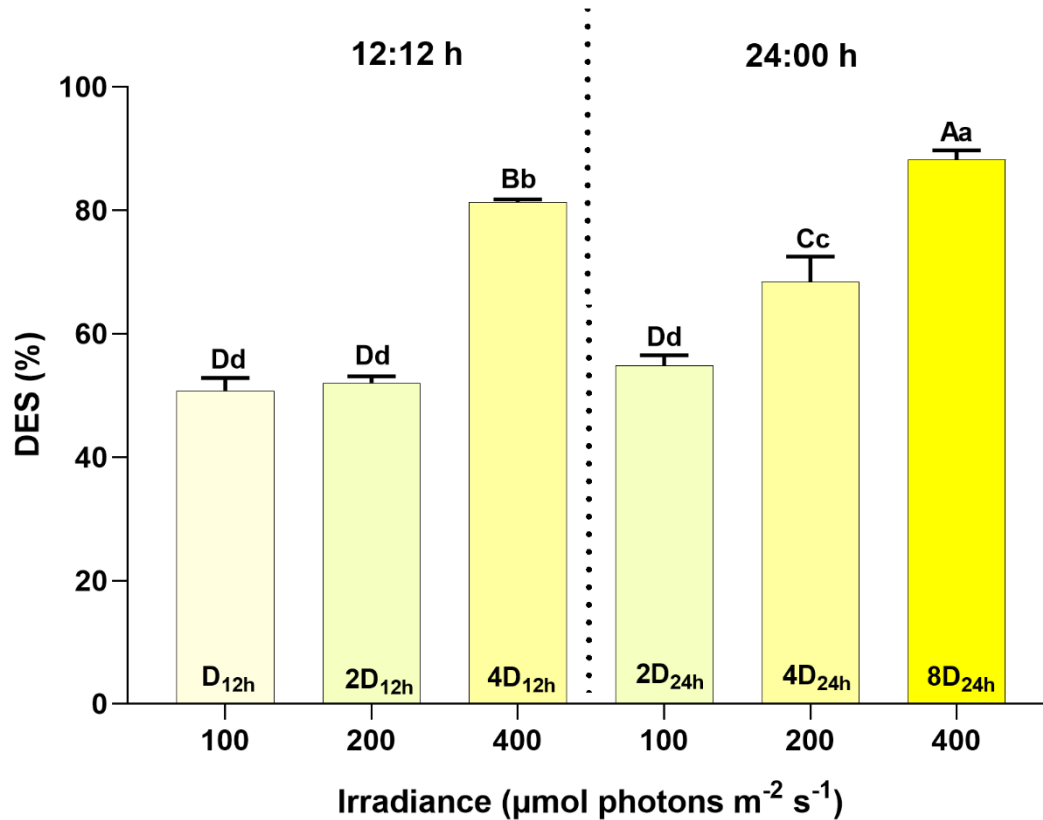


Each value is represented as mean \pm standard deviation of biological triplicates ($n = 3$). Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles obtained by two-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$). Different small letters represent the differences caused by the light energy doses and different italic letters represent the differences caused by the isolated factor irradiance, both obtained by one-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$).

The de-epoxidation state (DES, Fig. 8) at irradiances of 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reached approximately 2-fold the irradiances of 100 and 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which induces a rapid conversion from Ddx to Dtx as a necessity to photoprotect the photosynthetic apparatus. There were no significant differences ($p > 0.05$) between the same light energy doses of

2D_{12h}/2D_{24h} presenting a de-epoxidation of 52%, while significant differences ($p < 0.05$) were found at the 4D_{24h} dose being 1.2-fold higher than 4D_{12h} dose.

Figure 8. De-epoxidation state in *Phaeodactylum tricornutum* cells under different light energy doses ($D = 4.32 \text{ mol photons m}^{-2}$) and irradiances.

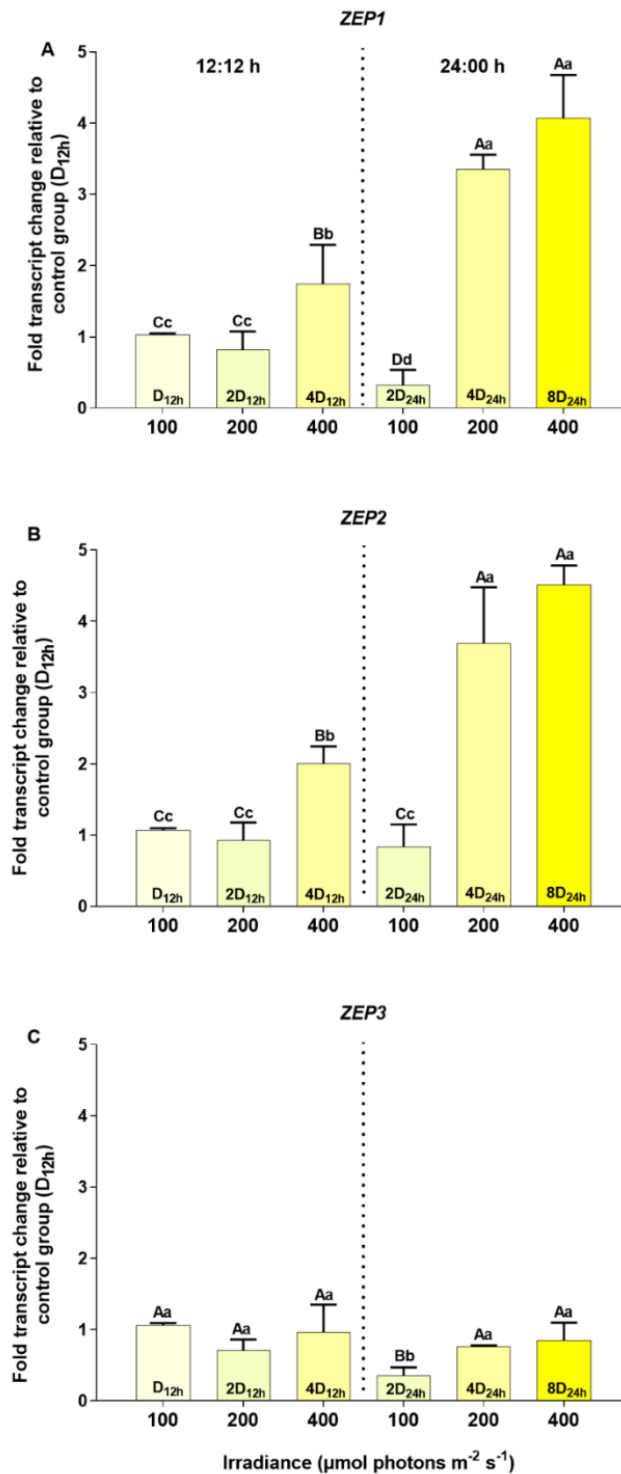


Each value is represented as mean \pm standard deviation of biological triplicates ($n = 3$). Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles obtained by two-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$). Different small letters represent the differences caused by the light energy doses obtained by one-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$).

2.3.4 Carotenoid biosynthesis genes transcript levels

In the present study, all treatments showed different transcription profiles ($p < 0.05$) in the regulation of light-dependent genes and with reactions related to the role of photoprotection. In the first group, which includes the *ZEP1*, *ZEP2* and *ZEP3* genes (Fig. 9A, 9B and 9C), a similar pattern between *ZEP1* and *ZEP2* was observed, characterized by the induction of relative gene overexpression ranging from 1.7-fold-change at dose 4D_{12h} to 3.4- and 4.0-fold-change at 4D_{24h} and 8D_{24h} doses, respectively. In opposition to the *ZEP1* and *ZEP2* genes, a smaller variation in the *ZEP3* gene expression was observed, in which only the 2D_{24h} dose presented a significant ($p < 0.05$) lower gene expression from the other treatments.

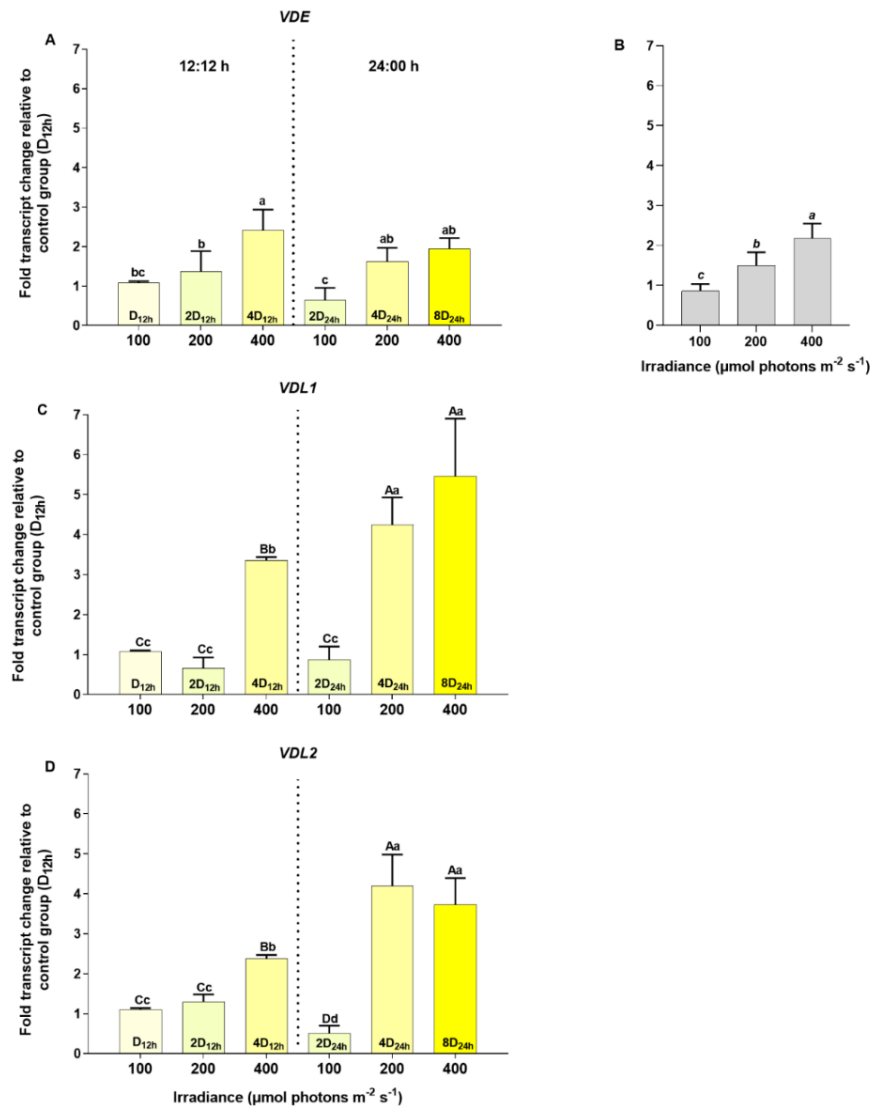
Figure 9. Gene transcript levels of *ZEP1* (A), *ZEP2* (B) and *ZEP3* (C) in *Phaeodactylum tricornutum* cells under different light energy doses (D = 4.32 mol photons m⁻²) and irradiances.



Each value is represented as mean \pm standard deviation of biological triplicates (n = 3). Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles obtained by two-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$). Different small letters represent the differences caused by the light energy doses obtained by one-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$).

The second group comprising the *VDE*, *VDL1* and *VDL2* genes (Fig. 10A and 10B, 10C and 10D), showed a transcription profile significantly ($p < 0.05$) similar to the *ZEP1* and *ZEP2* genes, with an increase in the transcripts level in the higher light energy doses and irradiances, while *VDE* expression had a lower stimulation than in *VDL1* and *VDL2* genes. Regarding *VDL1* and *VDL2*, higher values of relative gene overexpression were found at 4D_{12h}/4D_{24h} doses with a variation from 3.4- to 4.2-fold-change in *VDL1* and from 2.4- to 4.1-fold-change in *VDL2*. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the 4D_{24h} and 8D_{24h} doses of both genes.

Figure 10. Gene transcript levels of *VDE* (A and B), *VDL1* (C) and *VDL2* (D) in *Phaeodactylum tricornutum* cells under different light energy doses (D = 4.32 mol photons m⁻²) and irradiances.

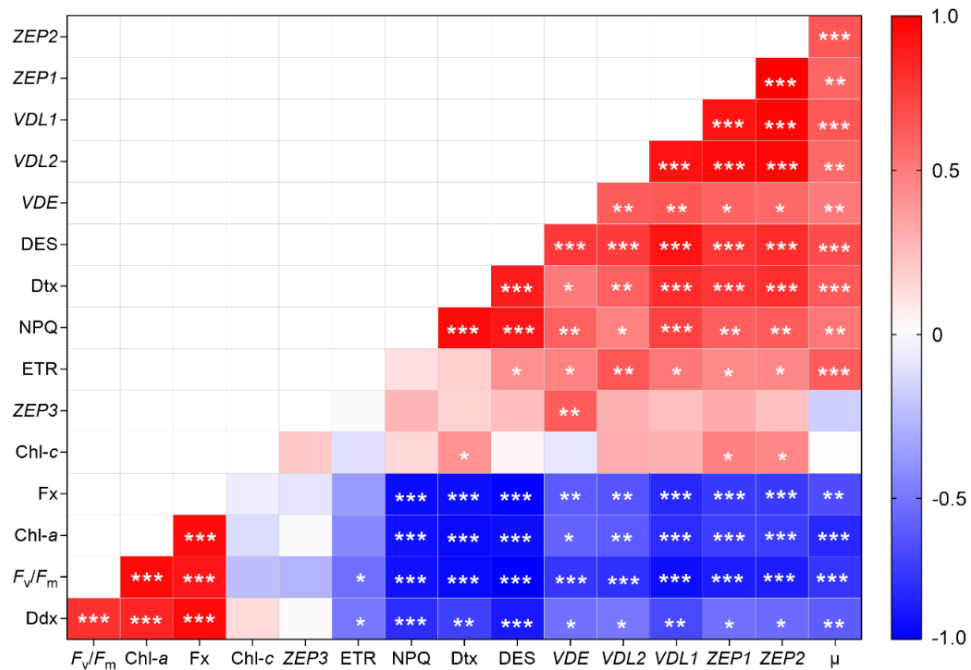


Each value is represented as mean \pm standard deviation of biological triplicates ($n = 3$). Different capital letters represent the differences caused by the interaction between the same irradiance on both L:D cycles obtained by two-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$). Different small letters represent the differences caused by the light energy doses and different italic letters represent the differences caused by the isolated factor irradiance, both obtained by one-way ANOVA (post hoc Tukey, $p < 0.05$).

2.3.5 Pearson correlation

In order to improve the interpretation of the data set and correlate the different responses obtained in this study, a Pearson correlation analysis was performed, in which the data were characterized according to their respective correlation coefficients and presented in a heatmap. As can be seen in Figure 11, Ddx showed a significant positive correlation with Chl-*a* ($r = 0.93$), Fx ($r = 0.93$) and F_v/F_m ($r = 0.89$). On the other hand, the same carotenoid showed a significant negative correlation with the parameters involved in the photoprotection mechanism, including the Dtx ($r = -0.70$), DES ($r = -0.84$), NPQ ($r = -0.77$) and the genes *VDE* ($r = -0.52$), *VDL1* ($r = -0.67$), *VDL2* ($r = -0.62$), *ZEP1* ($r = -0.72$) and *ZEP2* ($r = -0.72$). In addition, Dtx showed a strong positive correlation with DES ($r = 0.86$), NPQ ($r = 0.93$) and the genes *VDE* ($r = 0.50$), *VDL1* ($r = 0.80$), *VDL2* ($r = 0.60$), *ZEP1* ($r = 0.77$) and *ZEP2* ($r = 0.80$). There were no significant correlations for Chl-*c* or *ZEP3*. ETR and the specific growth rate (μ) showed a slightly negative correlation with the parameters involved in light capture and photoinhibition, while both showed a slight positive correlation with DES and the genes involved in the energy dissipation process

Figure 11. Heatmap based on Pearson's correlation coefficients between dependent variables of *Phaeodactylum tricornutum* cells exposed to different light energy doses.



The abbreviations used are: μ : specific growth rate; Chl-*a*: chlorophyll-*a*; Chl-*c*: chlorophyll-*c*; Ddx: diadinoxanthin; Dtx: diatoxanthin, Fx: fucoxanthin, DES: de-epoxidation state; F_v/F_m : PSII maximum quantum yield; NPQ: non-photochemical quenching; ETR: electron transport rate; ZEP1, ZEP2 and ZEP3: zeaxanthin epoxidase gene; VDE: violaxanthin de-epoxidase gene; VDL1 and VDL2: violaxanthin de-epoxidase-like gene. Asterisks indicates significant differences with weak (*, $p < 0.05$), moderate (**, $p < 0.01$) and strong correlations (***, $p < 0.001$).

2.4 DISCUSSION

Light energy is a crucial environmental parameter in phototrophic microalgae cultures as it has a significant influence on the growth and biochemical composition of these organisms. Therefore, its adequate supply is considered one of the greatest challenges in photoautotrophic cultures, which demand adequate amounts to avoid photolimitation and photoinhibition phenomena (Broddrick et al. 2019). In addition, efficient conversion of light energy is also required, as most diatoms grow in environments where light availability fluctuates drastically throughout the year requiring adaptation of the photosynthetic apparatus (Wagner et a. 2016; Zhou et al. 2021). The dissipation of this amount of absorbed energy occurs both in PSII and in the diatom-FCP in the form of heat or in a way to redirect electrons, so the carbon fixation process is not overloaded (Ramanan et al. 2014). Even so, our growth data reported that the highest irradiance tested did not affect the growth performance of *P. tricornutum*, probably due to the fact that the highest irradiance tested is within the photo-saturation zone, as indicated by the P-I curve.

The Bunsen-Roscoe reciprocity law states that the light energy absorbed by a given species of photosynthetic organism is proportional to the light energy it emits (Bunsen and Roscoe 1859). In this case, *P. tricornutum* has been shown to adjust well to light energy doses and irradiances. In fact, the irradiances are an amount of photons offered per each second, while the doses depend on the exposure time as well. This ability enables *P. tricornutum* to achieve a balance between light absorption and energy dissipation, thereby protecting itself from potential photodamage.

The F_v/F_m values reported in the present study are within the expected range at the lowest energy doses, since they generally reach a value close to 0.7 in non-stressed cultures (Masojídek et al. 2013). This ratio is often used as an estimate of the photochemical yield of PSII and also as an indicator of photoinhibition, since it is associated with high irradiance, possibly indicating that the increase in light intensity has caused stress to *P. tricornutum* cells. In particular, the reason for this yield decline is that cells absorb more light that can be utilized during photosynthetic process, resulting in the need for energy dissipation through the NPQ to avoid photo-oxidative damage. As reported by Seydoux et al. (2022), a similar relationship between NPQ and F_v/F_m during a high to low light relaxation/transition. Although, in the present study, an inversely proportional relationship was found between these indicators, suggesting that PSII did not maintain the same photochemical capacity during this variation.

Comparing the NPQ results with the F_v/F_m and ETR values at the highest light energy doses, it can be observed that there is a difference between the potential of ETR with the F_v/F_m , since ETR remained stable, even with a possible photoinhibition in the irradiance of 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Although the F_v/F_m represents the maximum functioning capacity of the photosystem in terms of energy use, the destination of this energy is more associated with the ETR, according to the data presented in this study. In fact, electron transport is not only used for carbon fixation and biomass production during photosynthesis, but it is also necessary for energy to be destined to activate other functions of the biochemical metabolism of microalgal cells (Depauw et al. 2012). One of the possible alternative routes is the use of this electron flow in the reduction of ferredoxin enzyme to activate nitrite reductase enzymes during nitrogen assimilation (Hippmann et al. 2022). Furthermore, it can also be used to activate the thioredoxin enzyme (Blommaert et al. 2021), that acts in the Calvin cycle and in Mehler reaction (Lepetit et al. 2022) aiming to eliminate potential ROS and other free radicals. This explains why ETR behaves differently than F_v/F_m and why it may not be positively correlated with Chl-*a* and Fx.

The most common feature of the acclimatization response to irradiance is a change in the level of pigmentation, typically associated with changes in the abundance of the antenna

complex. The high amount of the light-harvesting pigments (Chl-*a* and Fx) observed in this study are in agreement with Kuczynska et al. (2020), who also identified a significant increase of these parameters in low light in comparison to high light conditions. In addition, given the differences obtained in chlorophylls and Fx in comparison with Dtx and NPQ, it is possible to say that this antenna protein complex is involved in the acclimation regulation in *P. tricornutum* (Conceição et al. 2020).

Photoprotective mechanisms are induced to protect the antenna complex from overexcitation of the photosystems when the light intensity is too high or increases too rapidly for the photochemical phase to utilize the absorbed energy. Excess of excitation energy in the PSII antenna complex is dissipated as heat through many cellular reactions, which are referred to as non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence emission (Goss and Lepetit 2015).

Diatoms have developed efficient photoprotective mechanisms to minimize photoinhibition (Costa et al. 2013; Valle et al. 2014). Among the short-term defenses that are activated by a sudden increase in light intensity, photoprotective dissipation of excess absorbed light energy is known as an important mechanism, where the xanthophylls Ddx and Dtx are involved. NPQ is mainly controlled by the interconversion between epoxidation and de-epoxidation of carotenoids involved in Ddx-Dtx cycle and most of the excess energy is discarded as heat by a regulatory system involving the transthyllakoid Δ pH, which are of great importance in the photoregulation of photosynthesis (Lavaud et al. 2012; Seydoux et al. 2022). This energy-dependent system reduces the quantum efficiency of PSII, helping to prevent excessive PSII reduction and photoinhibitory damage (Fisher et al. 2020). Efficiently in effect, this system provides a means of dumping excess energy before it can damage the photosynthetic apparatus.

Our results showed that the physiological and molecular processes are connected with energy dissipation in *P. tricornutum*. The regulation of *VDL1* and *VDL2* genes at high irradiance is associated with an increase in NPQ and Dtx concentration while lower levels of Ddx and Fx were observed. In this scenario, violaxanthin de-epoxidase enzyme has the function of converting Ddx to Dtx, which is of great importance for the photoprotection mechanism in high irradiance.

On the other hand, *ZEP1* and *ZEP2* genes did not show an inverse reaction in relation to *VDL1* and *VDL2* genes, although it is known that the enhancement of Dtx synthesis requires the enhancement of epoxidases activity. Furthermore, the expression of these genes often show variation between samples collected at the end of the light phase and at the end of the dark

phase. This difference in sampling time could potentially influence the results, since diurnal fluctuations of the mentioned genes typically increase in amplitude during prolonged high light exposure, suggesting that their products may play a crucial role in long-term high light acclimation as reported by Kuczynska et al. (2020).

These genes are demonstrated, through transcriptomic and photophysiological analyses, as global regulators of photosynthetic acclimation to irradiance by participating in the xanthophyll cycle, which is involved in the acclimation of plastids to changes in environmental light conditions (Bowler et al. 2008; Eilers et al. 2016; Dautermann and Lohr 2017; Dautermann et al. 2020). Furthermore, Blommaert et al. (2021), concluded that *ZEP* enzyme is inhibited at light irradiances lower than the light saturation (E_K) and the onset of NPQ. Also, according to the same authors, this regulation of *ZEP* genes during high irradiance may be associated with the *ZEP* enzymes reactivation, since this is linked to chloroplast redox regulation with thioredoxin proteins. In this case, the overexpression of these genes at higher irradiance may be related to the excess of electrons destined for the photosynthetic process. Furthermore, the balance adjustment of the Ddx-Dtx cycle and the relaxation of the NPQ seem to be affected by the size of the pool of these xanthophylls in relation to the regulation of the *VDL* and *ZEP* genes in *P. tricornutum*.

According to Bai et al. (2022), there is an interaction between the isoforms of *VDL2* and *ZEP1*, *VDL1* and *ZEP2* as well as *VDE* and *ZEP3* genes, which were evolved by the duplication of enzyme-encoding genes with important roles in the Fx biosynthesis, preferably related to the photoprotection mechanism. However, the activation and localization of VDL proteins may differ from those of VDE proteins, as the Glu-rich domain in *VDL1* and *VDL2* sequences has been entirely swapped with a neutral C-terminal domain, as reported by Coesel et al. (2008). In this case, our results suggest that *ZEP1*, *ZEP2*, *VDL1* and *VDL2* genes may be more efficiently and eventually related to the photoprotection, since *VDE* and *ZEP3* genes were not. In addition, our results showed these genes were similar to each other in a way that their expression was not correlated to the photoperiod which are in agreement with Kuczynska et al. (2020). An interesting discovery was reported by Dautermann et al. (2020) where the VDL enzymes play a crucial role as it utilize Vx, a major substrate, to direct carotenoids into either the photoprotective or light-harvesting branch of carotenoid biosynthesis, in the same way as Nx serves as the precursor for both Ddx and Fx. In addition, it is of great importance to explore and characterize the Fx biosynthetic pathway to identify the enzymes involved that have not yet been discovered and the specificity of their reactions, which can highlight even more the diversification of carotenoid functions in chromalveolate algae.

2.5 CONCLUSION

In conclusion, this study demonstrated the Bunsen-Roscoe reciprocity law was valid, since the use of light energy doses and irradiances affected the photoacclimation and photoprotection responses in *P. tricornutum*. The specific growth rate was 1.9-fold higher in 8D_{24h} dose with 3-fold higher light absorption in comparison to dose D_{12h}, even though there was more light stress as indicated by the photosynthetic parameters. The higher content of the pigments involved in the light-harvesting complex were influenced by low light intensity, while the regulation of the xanthophyll cycle was potentiated by the highest light energy doses. The transcriptional profile of the *ZEP1*, *ZEP2*, *VDL1* and *VDL2* genes was influenced by the highest light energy doses, except for *VDE* and *ZEP3* genes, which were poorly regulated by light. In addition, a similar transcription pattern was found between two isoforms of *ZEP* genes as well as in *VDL* genes, which suggests the importance of both transcription products on photoprotection in *P. tricornutum*.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Brazilian Ministry of Science, Technology, Innovation and Communications (MCTIC) for financial support provided.

2.7 FUNDING STATEMENT

The research was funded by the Funding Authority for Studies and Projects (FINEP) (Agreement No. 01.10.0457.00) and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Case No. 407513/2013-2).

2.8 AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

All authors participated in the conception and design of the experiment. HC, CN, JBB and LRR performed the fluorescence analysis. HC, CLVB and JJM performed the molecular analysis. HC, CMB and MM performed the pigment analysis. HC, JBB and CYBO interpreted the data and discussed the results. HC drafted the article. RGL, JBB, MM, LRR, ACDB, MRFM and RBD critically reviewed the article and contributed with intellectual input. All authors approved submission of the article.

2.9 DATA AVAILABILITY

Data will be made available on request.

2.10 DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

2.11 REFERENCES

Andrade KAM, Lauritano C, Romano G, Ianora A (2018) Marine microalgae with anti-cancer properties. *Mar Drugs* 16:165

APHA (2011) Standard methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association, Washington DC

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M et al. (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306:79-86

Bai Y, Cao T, Dautermann O, Buschbeck P, Cantrell MB, Chen Y, Lein CD, Shi X, Ware MA, Yang F, Zhang H, Zhang L, Peers G, Li X, Lohr M (2022) Green diatom mutants reveal an intricate biosynthetic pathway of fucoxanthin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119:e2203708119

Bauer CM, Schmitz C, Corrêa RG, Herrera CM, Ramlov F, Oliveira ER, Pizzato A, Varela LAC, Cabral DQ, Yunes RA, Lopes RG, Cella H, Rocha M, Rorig, LR, Derner RB, Abreu PC, Maraschin M (2019) In vitro fucoxanthin production by the *Phaeodactylum tricorutum* diatom. In: Rahman A (eds) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Karachi, pp 211-242.

Blommaert L, Chafai L, Bailleul B (2021) The fine-tuning of NPQ in diatoms relies on the regulation of both xanthophyll cycle enzymes. *Sci Rep* 11:12750

Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otillar RP et al. (2008) *Phaeodactylum tricorutum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456:239-244

Broddrick JT, Du N, Smith SR, Tsuji Y, Jallet D, Ware MA, Peers G, Matsuda Y, Dupont CL, Mitchell BG, Palsson BO, Allen AE (2019) Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *New Phytol* 222:1364-1379

Büchel C, Goss R, Bailleul B, Campbell D, Lavaud J, Lepetit B (2022) Photosynthetic light reactions in diatoms. I. The lipids and light-harvesting complexes of the thylakoid membrane. *The molecular life of diatoms*. Springer International Publishing, pp. 397-422.

Bunsen R, Roscoe H (1859) Photochemische untersuchungen. *Ann Phys Chem* 184: 193–273
Coesel S, Oborník M, Varela J, Falciatore A, Bowler C (2008) Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms. *PLOS ONE* 3:e2896

Conceição D, Lopes RG, Derner RB, Cella H, do Carmo APB, D'Oca MGM, Petersen R, Passos MF, Vargas JVC, Galli-Terasawa LV, Kava V (2020) The effect of light intensity on

the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl Phycol* 32:1017-1025

Costa BS, Jungandreas A, Jakob T, Weisheit W, Mittag M, Wilhelm C (2013) Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* 64:483-493

Dambek M, Eilers U, Breitenback J, Steiger S, Büchel C, Sandmann G (2012) Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* 63:5607-5612

Dautermann O, Lohr M (2017) A functional zeaxanthin epoxidase from red algae shedding light on the evolution of light-harvesting carotenoids and the xanthophyll cycle in photosynthetic eukaryotes. *Plant J* 92:879-891

Dautermann O, Lyska D, Andersen-Ranberg J, Becker M, Fröhlich-Nowolsky J, Gartmann H, Krämer LC, Mayr K, Pleper D, Rij LM, Wipf HM-L, Niyogi KK, Lohr M (2020) An algal enzyme required for biosynthesis of the most abundant marine carotenoids. *Sci Adv* 6:eaaw9183

Depauw FA, Rogato A, d'Alcalà MR, Falciatore A (2012) Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. *J Exp Bot* 63:1575-1591

Eilers U, Dietzel L, Breitenbach J, Büchel C, Sandmann G (2016) Identification of genes coding for functional zeaxanthin epoxidases in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Plant Physiol* 192:64-70

Enríquez S, Borowitzka MA (2010) The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae. In: Suggett DJ, Prášil O, Borowitzka MA (eds) *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer, Dordrecht, pp. 187-208.

Falciatore A, Jaubert M, Bouly J, Bailleul B, Mock T (2020) Diatom molecular research comes of age: model species for studying phytoplankton biology and diversity. *The Plant Cell* 32:547-572

Fisher NL, Campbell DA, Hughes DJ, Kuzhiumparambil U, Halsey KH, Ralph PJ, Suggett DJ (2020) Divergence of photosynthetic strategies amongst marine diatoms. *PLOS ONE* 15:e0244252

Gelzinis A, Buktus V, Songaila E, Augulis R, Gall A, Büchel C, Robert B, Abramavicius D, Zigmantas D, Valkunas L (2015) Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex. *Biochim Biophys Acta* 1847:241-247

Goss R, Lepetit B (2015) Biodiversity of NPQ. *J Plant Physiol* 172:13-32

Hippmann AA, Schuback N, Moon KM, McCrow JP, Allen AE, Foster LF, Green BR, Maldonado MT (2022) Proteomic analysis of metabolic pathways supports chloroplast-mitochondria cross-talk in a Cu-limited diatom. *Plant Direct* 6:e376

- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equation for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural populations. *Biochem Physiol Pflanze* 167:191-194
- Johnsen G, Sakshaug E (2007) Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulse-amplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry. *J Phycol* 43:1236-1251
- Krause-Jensen D, Sand-Jensen K (1998) Light attenuation and photosynthesis of aquatic plant communities. *Limnol Oceanogr* 43:396-407
- Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K (2015) Photosynthetic pigments in diatoms. *Mar Drugs* 13:5847-5881
- Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Nowicka B, Jakubowska A, Strzalka W, Burda K, Strzalka K (2020) The xanthophyll cycle in diatom *Phaeodactylum tricornerutum* in response to light stress. *Plant Physiol Biochem* 152:125-137
- Lavaud J, Materna AC, Sturm S, Vugrinec S, Kroth PG (2012) Silencing of the violaxanthin de-epoxidase gene in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* reduces diatoxanthin synthesis and non-photochemical quenching. *PLOS ONE* 7:e36806
- Lepetit B, Volke D, Gilbert M, Wilhelm C, Goss R (2010) Evidence for the existence of one antenna-associated, lipid-dissolved and two protein-bound pools of diadinoxanthin cycle pigments in diatoms. *Plant Physiol* 154:1905-1920
- Lepetit B, G lin G, Lepetit M, Sturm S, Vugrinec S, Rogato A, Kroth PG, Falciatore A, Lavaud J (2017) The diatom *Phaeodactylum tricornerutum* adjusts nonphotochemical fluorescence quenching capacity in response to dynamic light via fine-tuned Lhcx and xanthophyll cycle pigment synthesis. *New Phytol* 214:205-218
- Lepetit B, Campbell D, Lavaud J, Büchel C, Goss R, Bailleul B (2022) Photosynthetic light reactions in diatoms. II. The dynamic regulation of the various light reactions. In: Falciatore A, Mock T (eds) *The molecular life of diatoms*. Springer, Cham, pp. 423-464.
- Liu Y, Zheng J, Zhang Y, Wang Z, Yang Y, Bai M, Dai Y (2016) Fucoxanthin activates apoptosis via inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and suppresses invasion and migration by restriction of p38-MMP-2/9 pathway in human glioblastoma cells. *Neurochem Res* 41:2728-2751
- Lohr M, Wilhelm C (2001) Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 212:382-391
- Lopes RG, Cella H, Mattos JJ, Marques MRF, Soares AT, Antoniosi-Filho NR, Derner RB, R rig LR (2019) Effect of phosphorus and growth phases on the transcription levels of EPA biosynthesis genes in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *Braz J Bot* 42:13-22

- Lopes FG, Oliveira KA, Lopes RG, Poluceno GG, Simioni C, Silva GP, Bauer CM, Maraschin M, Derner RB, Garcez RG, Tasca CI, Nedel CB (2020) Anti-cancer effects of fucoxanthin on human glioblastoma cell line. *Anticancer Res* 40:6799-6815
- Malapascua JRF, Jerez CG, Sergejevová M, Figueroa FL, Masojídek J (2014) Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquat Biol* 22:123-140
- Masojídek J, Torzillo G, Koblizek M (2013) Photosynthesis in microalgae. In: Richmond A, Hu Q (eds.) *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 21-36.
- Nymark M, Valle KC, Brembu T, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G, Bones AM (2013) Molecular and photosynthetic responses to prolonged darkness and subsequent acclimation to re-illumination in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLOS ONE* 8:e58722
- Pajot A, Lavaud J, Carrier G, Lacour T, Marchal L, Nicolau E (2023) Light-response in two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*: Evidence for different photoprotection strategies. *Algal Res* 69:102915
- Ragni M, d'Alcalà MR (2007) Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricornutum*: pigment content. *J Plankton Res* 29:141-156
- Ramanan C, Berera R, Gundermannb K, Stokkum I, Büchel C, Grondelle R (2014) Exploring the mechanism(s) of energy dissipation in the light harvesting complex of the photosynthetic algae *Cyclotella meneghiniana*. *Biochim Biophys Acta* 1837:1507-1513
- Rhinn H, Scherman D, Escriou V (2008) One-step quantification of single-stranded DNA in the presence of RNA using Oligreen in a real-time polymerase chain reaction thermocycler. *Anal Biochem* 372:116-118
- Ruban AV, Lavaud J, Rousseau B, Guglielmi G, Horton P, Etienne AL (2004) The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photosynth Res* 82:165–175
- Sales R, Derner RB, Tsuzuki MY (2019) Effects of different harvesting and processing methods on *Nannochloropsis oculata* concentrates and their application on rotifer *Brachionus* sp. cultures. *J Appl Phycol* 31:3607-3615
- Serôdio J, Lavaud J (2020) Diatoms and their ecological importance. In: Leal Filho W, Azul AM, Brandi L, Lange Salvia A, Wall T. (eds) *Life Below Water. Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals*. Springer, pp. 1-9
- Seydoux C, Storti M, Giovagnetti V, Matuszyńska A, Guglielmino E, Zhao X, Giustini C, Pan Y, Blommaert L, Angulo J, Ruban AV, Hu H, Bailleul B, Courtois F, Alloreant G, Finazzi G (2022) Impaired photoprotection in *Phaeodactylum tricornutum* KEA3 mutants reveals the proton regulatory circuit of diatoms light acclimation. *New Phytol* 234:578-591

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 3:1101-1108

Schmitz C, Nunes A, Bauer CM, Barufi JB, Maraschin M (2022) Monitoring the stability of the xanthophyll fucoxanthin in microalga and seaweed biomasses, and extracts stored at low temperatures. *Res Soc Dev* 11:e577111537712

Sharma N, Simon DP, Diaz-Garza AM, Fantino E, Messaabi A, Meddeb-Mouelhi F, Germain H, Desgagné-Penix I (2021) Diatoms biotechnology: various industrial applications for a greener tomorrow

Strickland JDH, Parsons TR (1972) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa

Valle KC, Nymark M, Aamot I, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G, Brembu T, Bones AM (2014) System responses to equal doses of photosynthetically usable radiation of blue, green, and red light in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PLOS ONE* 9:e114211

Wagner H, Jakob T, Lavaud J, Wilhelm C (2016) Photosystem II cycle activity and alternative electron transport in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under dynamic light conditions and nitrogen limitation. *Photosynth Res* 128:151-161

Ye Y, Huang Y, Xia A, Fu Q, Liao Q, Zeng W, Zheng Y, Zhu X (2018) Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity. *Bioresour Technol* 270:80-87

Zhou L, Wu S, Gu W, Wang L, Wang J, Gao S, Wang G (2021) Photosynthesis acclimation under severely fluctuating light conditions allows faster growth of diatoms compared with dinoflagellates. *BMC Plant Biol* 21:164

CAPÍTULO 3

EFEITOS DA RADIAÇÃO UV NA FOTOPROTEÇÃO E FOTOSSÍNTESE DE *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA SOB DIFERENTES DOSES DE ENERGIA LUMINOSA

Herculano Cella ^{a*}, Camila Lisarb Velasquez Bastolla ^b, Camila Nader ^a, José Bonomi-Barufi ^c, Carlos Yure Oliveira ^c, Rafael Garcia Lopes ^a, Jacó Joaquim Mattos ^b, Paulo Antunes Horta Junior ^c, Cândice Maria Boff ^c, Eva Regina de Oliveira Rodrigues ^d, Marcelo Maraschin ^d, Leonardo Rubi Rörig ^c, Afonso Celso Dias Bainy ^b, Maria Risoleta Freire Marques ^b, Roberto Bianchini Derner ^a

^a Laboratory of Algae Cultivation, Department of Aquaculture, Center of Agrarian Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^b Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^c Laboratory of Phycology, Department of Botany, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^d Laboratory of Plant Morphogenesis and Biochemistry, Center of Agrarian Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: hercu.ufsc@yahoo.com.br. Address: Beco dos Coroas, 503, 88061-600, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Phone number: +554899919-4867.

ORCID: 0000-0003-2558-7242

Abstract

The ability of diatoms to adapt to variable light conditions such as photosynthetically active radiation (PAR) and ultraviolet radiation (UVR) is crucial for their survival and their role in supporting aquatic ecosystem food chains. The aim of the study was to investigate how different doses of UVR regulate the photoprotection mechanism in *Phaeodactylum tricornerutum*. Cultures were exposed to two intensities of UV radiation (17.5 and 35 W m⁻²) and two exposure times to UVR (6 and 12 h), resulting in different daily doses of UVR energy (D = 378 KJ m⁻²). The growth of *P. tricornerutum* was significantly affected by UVR doses, with a growth pattern of 42-55% below the control group (PAR only). Increasing UVR dose also had negative effects on photosynthesis parameters and the levels of chlorophyll-*a* and fucoxanthin. The de-epoxidation state mediated through the interconversion between diadinoxanthin and diatoxanthin showed a high rate in treatments subjected to higher UVR doses, promoting an attempt to activate cellular protection mechanisms. The transcriptional genes related to the xanthophyll cycle, including a reduction in transcript levels of *ZEP1*, *ZEP2*, *ZEP3* genes and an increase in transcript levels of *VDE*, *VDL1*, and *VDL2* genes, was affected by UVR radiation, suggesting a modification in the cell's ability to respond to light stress.

Keywords: Microalgae, high light stress, photosynthesis, radiation, transcript level.

3.1 INTRODUÇÃO

As diatomáceas desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos e também contribuem significativamente para os ciclos biogeoquímicos globais, especialmente no sequestro de carbono (STANCHEVA; LOWE, 2019). A capacidade de adaptação das diatomáceas a condições de luz variáveis destacam o seu papel crucial na sustentação das teias alimentares, deste modo compreender a resposta das diatomáceas à luz, em particular à Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR) e à Radiação Ultravioleta (UVR), é essencial para compreender sua função e adaptabilidade ecológica (JIN *et al.*, 2023).

A PAR, que abrange a faixa de comprimento de onda de 400 a 700 nm, é a parte do espectro luminoso utilizada por organismos fotossintéticos para conduzir a fotossíntese (TUCHIN, 2015). Nas microalgas, a absorção do PAR é fundamental para a conversão de energia luminosa em energia química para as células. No entanto, em condições de alta intensidade luminosa, as diatomáceas podem sofrer fotoinibição, onde a luz em excesso sobrecarrega o maquinário fotossintético, levando a uma redução na eficiência fotossintética e possíveis danos celulares (BLOMMAERT *et al.*, 2021).

A UVR, que inclui as faixas de UV-A (320-400 nm) e UV-B (280-320 nm), pode provocar efeitos adversos sobre as diatomáceas. Embora uma pequena parte do UV-A possa ser utilizada na fotossíntese, tanto o UV-A quanto o UV-B são geralmente considerados prejudiciais devido ao seu potencial para causar danos moleculares (JIN *et al.*, 2023). A radiação UV pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, e pode prejudicar os centros de reação do Fotossistema II (PSII) (LEPETIT *et al.*, 2022).

A resposta das diatomáceas a essas condições de luz pode ser estudada de maneira detalhada por meio de parâmetros de fluorescência da clorofila-*a*. Parâmetros-chave de fluorescência, incluindo o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) e o rendimento quântico efetivo do PSII (Y_{II}), fornecem informações sobre a saúde e funcionalidade do sistema fotossintético em diferentes regimes de luz (MALAPASCUA *et al.*, 2014). Além disso, mecanismos como a dissipação não-fotoquímica (NPQ) por exemplo, o qual as diatomáceas empregam para dissipar o excesso de energia luminosa em forma de calor, podem ser quantificados para entender suas estratégias de proteção contra a luz excessiva (GOSS; LEPETIT, 2015).

Neste contexto, *Phaeodactylum tricornutum* é uma espécie de diatomácea amplamente estudada e serve como organismo-modelo para explorar processos fotobiológicos fundamentais. Investigar como diferentes doses de energia luminosa afetam os mecanismos de

captação da luz, eficiência fotossintética e fotoproteção, é crucial para entender como as radiações PAR e UVR influenciam o crescimento e outras atividades metabólicas nesses organismos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Cepa e manutenção dos cultivos

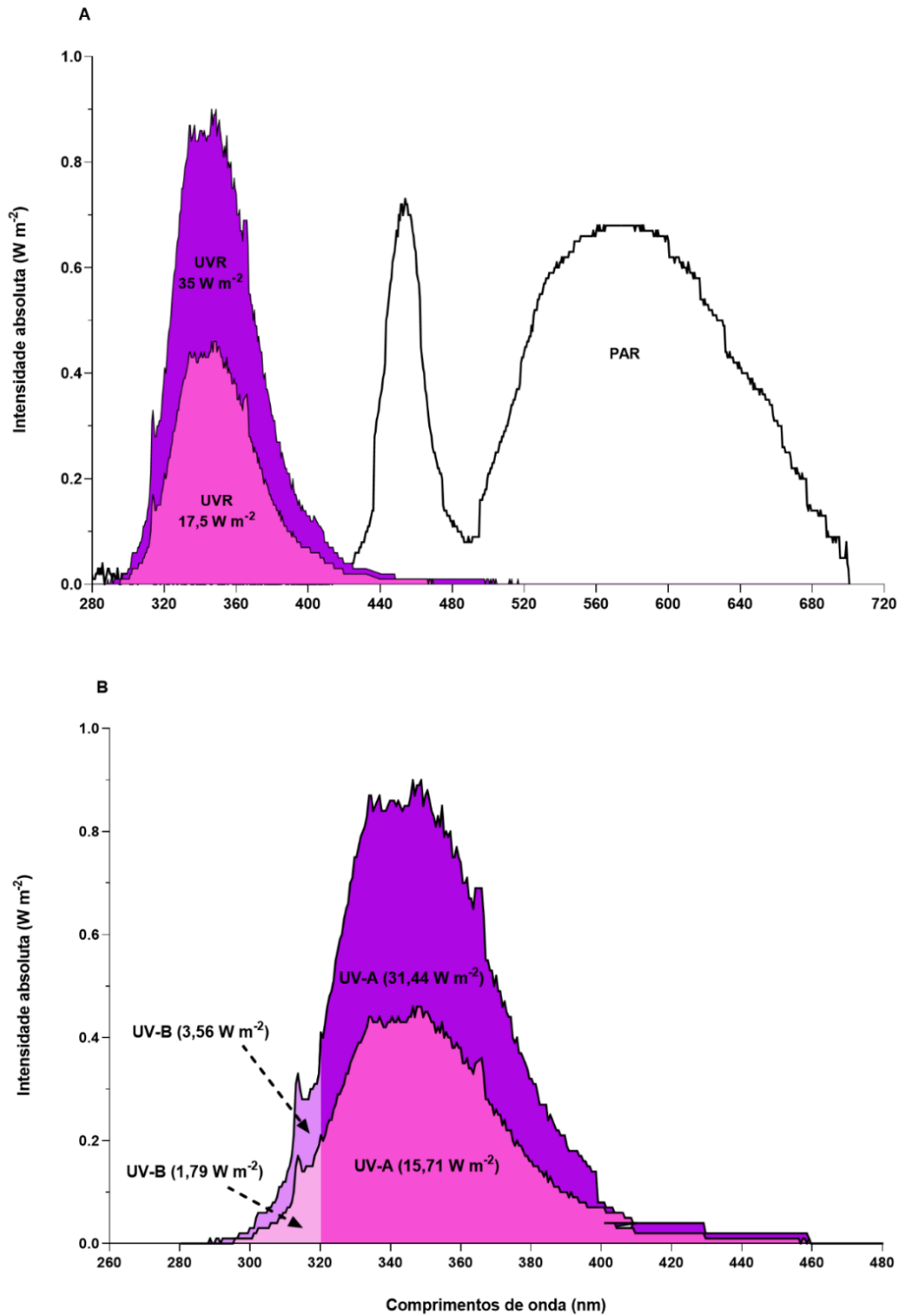
A cepa da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (CCAP 1055/1) foi mantida no Cepário do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAFIC-UFSC). A cultura-mãe foi desenvolvida em Erlenmeyer contendo 2000 mL de meio de cultura f/2 (Guillard, 1975), com agitação constante através do borbulhamento com ar atmosférico, em uma irradiância de $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 12:12 h e em temperatura de 21 ± 1 °C.

3.2.2 Fontes de radiação

A Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR) foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes (Phillips TL-D 36 W) e a Radiação UV (UVR) foi proveniente de lâmpadas Q-Panel UV-AB 340. O espectro de radiação das lâmpadas utilizadas está apresentado na Figura 1A, enquanto os tipos de UVR estão representados na Figura 1B.

A medida de intensidade de irradiância PAR ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi obtida com auxílio de um quantômetro (LI-250A, LI-COR) e a intensidade de UVR (W m^{-2}), foi obtida com o quantômetro (MACAM Ultraviolet Radiometer). As medidas de espectro de radiação total emitidas pelas fontes de PAR e UVR foram obtidas através do espectrorradiômetro (Avantes Starline, AvaSpec-2048).

Figura 1. Espectros de radiação das fontes de luz PAR e UVR (A) e os tipos de radiação UVR (B).



3.3.3 Tratamentos

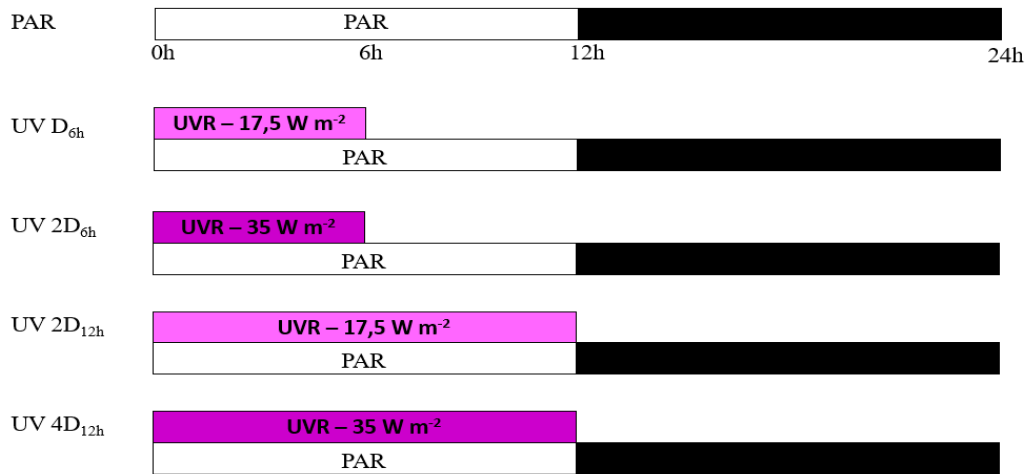
As culturas foram aclimatadas durante 7 dias e o experimento foi conduzido em frascos de vidro (Becker) de 200 mL (em triplicata), nas mesmas condições experimentais da cultura-mãe mencionada no tópico 3.2.1. Culturas expostas somente a radiação PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram utilizadas como grupo controle. Os tratamentos com diferentes doses de radiação UVR permaneceram sob intensidade $17,5 \text{ W m}^{-2}$ por 6h e 12h e o dobro da intensidade (35 W m^{-2}) por 6h e 12h, totalizando diferentes doses de UVR conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Valores das doses e intensidades de radiação UV para cada tratamento exposto.

Tratamentos	Intensidade absoluta (W m^{-2})	Tempo de exposição à UVR (h)	Dose (KJ m^{-2})
PAR	-	-	-
D _{6h}	17,5	6	378
2D _{6h}	35,0	6	756
2D _{12h}	17,5	12	756
4D _{12h}	35,0	12	1512

Todos os tratamentos com radiação UVR foram combinados com radiação PAR em fotoperíodo 12:12 h (Fig. 2). Para os tratamentos com o dobro da intensidade, foi utilizado um sombrite somente na lâmpada fluorescente branca para que todos os tratamentos recebessem a mesma quantidade de PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). As culturas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 0, 24, 48 e 72 h para análises de biomassa, absorção da luz e parâmetros fotossintéticos, enquanto para as análises do teor de pigmentos e análises moleculares, as amostras foram coletadas nos seguintes intervalos de tempo: 0, 24 e 72 h.

Figura 2. Esquema visual do delineamento experimental.



3.3.4 Determinação da biomassa

A biomassa (peso seco) foi estimada indiretamente a partir de uma regressão linear ($R^2 = 0,9963$) através da leitura da Unidade Nefelométrica de Turbidez (NTU) utilizando o turbidímetro (Alfakit) conforme com a equação 1:

$$Biomassa (g L^{-1}) = NTU * 0,0025 \quad (1)$$

3.3.5 Determinação do coeficiente de atenuação da luz

As medidas de atenuação da luz foram realizadas no centro das unidades experimentais contendo células em suspensão de *P. tricornutum* em uma profundidade de 10 cm. Foram coletados dados de irradiância para cada tratamento, em três posições distintas: posição A (frente), posição B (meio) e posição C (atrás) com auxílio de um quantômetro (LI-250A, LICOR). O coeficiente de atenuação da luz (k) foi calculado de acordo com a equação 2:

$$I_z = I_0 e^{-kz} \quad (2)$$

Onde I_z = irradiância na profundidade da cultura ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$); I_0 = irradi\u00e2ncia emitida pela lâmpada fluorescente de 36 W ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e z = profundidade do frasco de vidro (m).

3.3.6 Absorção da luz

Após os cálculos do coeficiente de atenuação da luz (k), os dados foram utilizados para calcular a absorção da luz de acordo com a equação 3:

$$AB (\%) = (1 - k) * 100 \quad (3)$$

3.3.7 Medições da fotossíntese a partir da fluorescência da Clorofila-*a* do fotossistema II

Os parâmetros fotossintéticos foram medidos através da fluorescência com pulso de amplitude modulada com o auxílio do WATER-PAM (Heinz Walz GmbH, 2000) de acordo com Cella et al. (2023).

Durante a aclimatação, os níveis de fluorescência mínimo (F_0) e máximo (F_m) foram medidos após uma adaptação no escuro por 10 minutos para calcular o rendimento quântico máximo no PSII (F_v/F_m), enquanto os níveis de fluorescência estável (F) e máxima (F_m') foram medidos após uma adaptação no período claro por 10 minutos para calcular o rendimento efetivo no PSII (Y_{II}). As fluorescências foram coletadas em intervalos de uma hora em ambos os períodos a fim de determinar os rendimentos máximos. Após 7 dias, o Y_{II} se manteve constante, indicando a aclimatação das células de *P. tricorutum* às condições ambientais propostas (o experimento só começou quando essa estabilidade no Y_{II} foi alcançada).

Para realizar uma estimativa adequada da taxa de transporte de elétrons (ETR), é importante considerar a razão de clorofilas associadas a cada fotossistema. Nesse contexto, essas razões foram determinadas por Johnsen e Sakshaug (2007) considerando diferentes espécies de algas marinhas com composição pigmentar diversificada. Portanto, a fração de clorofila-*a* associada ao PSII (F_{II}) de *Phaeodactylum tricorutum*, aclimatada em baixa irradiância, foi fornecida por esses autores. A absortância (ABS_t) pode ser estimada pelos valores de transmitância (T) assim como proposto por Enríquez e Borowitzka (2010) de acordo com a equação 4:

$$ABS_t = 1 - T \quad (4)$$

3.3.8 Determinação do teor de pigmentos

Em cada intervalo de tempo foram coletadas amostras de 5 mL de cada unidade experimental. As amostras foram filtradas com microfiltro de fibra de vidro 0,45 μ M e congeladas a -20 °C para posterior análise. Os pigmentos fotossintetizantes, clorofilas *a* e *c* ($c_1 + c_2$) foram extraídos com acetona 90% e quantificados em espectrofotômetro UV-vis

(Multileitora Infinite M200, Tecan) nos comprimentos de onda 664 e 630 nm, de acordo com as equações 5 e 6, respectivamente (STRICKLAND; PARSONS, 1972). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram normalizados pela biomassa seca (g L^{-1}) e expressos em mg g^{-1} de biomassa seca (DW).

$$\text{Clorofila} - a \ (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11,47 \times A_{664} - 0,40 \times A_{630} \quad (5)$$

$$\text{Clorofila} - c \ (\mu\text{g mL}^{-1}) = 24,36 \times A_{630} - 3,73 \times A_{664} \quad (6)$$

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para a quantificação dos carotenoides diadinoxantina, diatoxantina e fucoxantina na fração metanólica (MeOH) do extrato de *P. tricornutum*. Uma alíquota de cada amostra (10 μL , $n = 3$) foi injetada em um cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com uma coluna de fase reversa C18 (Vydac 218TP54, 250 mm x 4,6 mm, $\text{Ø} 5 \mu\text{m}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$), protegido por uma coluna de guarda de fase reversa (Vydac 218GK54, $\text{Ø} 5 \mu\text{m}$) e um detector UV-vis (450 nm). A eluição foi realizada com MeOH/ CH_3CN (90:10, v/v) em uma vazão de 1 mL min^{-1} . A identificação da diadinoxantina, diatoxantina e fucoxantina foi realizada utilizando seu tempo de retenção e co-cromatografia de padrão analítico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação dos metabólitos foi baseada em curva padrão de fucoxantina ($1\text{-}25 \mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 0,0513x$; $R^2 = 0,999$) de acordo com Schmitz *et al.* (2022). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg g^{-1} de biomassa seca (DW). O estado de de-epoxidação (DES) foi calculado de acordo com a equação 7 proposta por Ruban *et al.* (2004):

$$DES = \frac{Dtx}{Dtx + Ddx} \times 100 \quad (7)$$

Onde Dtx = teor de diatoxantina (mg g^{-1}) e Ddx = teor de diadinoxantina (mg g^{-1}).

3.3.9 Extração de RNA total, transcrição reversa e avaliação dos níveis de transcritos via qPCR

As amostras foram processadas de acordo com Cella *et al.* (2023). Cada unidade experimental foi centrifugada a $2950 \times g$ durante 5 minutos, lavadas uma vez com água do mar estéril, com o pellet imediatamente congelado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. A extração do RNA total das amostras de *P. tricornutum* ($n = 3$, 100 mg) foi realizada com o reagente Qiazol (Qiagen, Hilden,

Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A extração foi realizada com o método de congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido durante a etapa de homogeneização para garantir um rompimento celular eficiente. A pureza e a concentração do RNA total foram quantificadas por espectrometria em NanoDrop®ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A transcrição reversa foi realizada utilizando o Kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram diluídas e armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises moleculares.

Os níveis de transcritos de seis genes envolvidos no ciclo diadinoxantina-diatoxantina foram baseados em Cella *et al.* (2023), assim como demonstrados na tabela 2. A avaliação dos níveis de mRNA foi realizada pelo kit QuantiNova SYBR Green PCR (Qiagen) e quantificada usando o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). Em todas as unidades experimentais foram realizadas reações de qPCR utilizando 100 ng de cDNA como molde num volume total de reação de 20 µL. As condições dos ciclos foram as seguintes: ativação inicial da PCR (95 °C por 5 minutos); desnaturação (95 °C por 10 segundos) e combinação de anelamento/extensão (60 °C por 30 segundos) repetido para um total de 35 ciclos. Os fragmentos amplificados foram submetidos a uma curva de fusão (72 °C a 95 ± 1 °C) para garantir que não ocorressem anelamentos não-específicos. Em cada corrida, um controle negativo de transcrição reversa (RNA tratado com DNase) foi incluído, assim como um branco de controle em duplicata (água molecular ultrapura).

Em cada corrida, a eficiência (E) da qPCR foi verificada para cada par de iniciadores pela construção de uma curva padrão a partir de diluições seriadas (1:2) com 800; 400; 200; 100 e 50 ng (em duplicata) a partir de um conjunto de todas as amostras de cDNA (n = 45). Somente curvas com eficiências que variam entre 99% e 101% foram utilizadas e E foi automaticamente calculada empregando o software Rotor Gene 6000 Series. A normalização para cada gene alvo foi realizada de acordo com Rhinn *et al.* (2008), com base na concentração de cDNA presente nas amostras. Todos os dados foram calibrados pelos níveis de mRNA do grupo controle (PAR) e os resultados foram analisados pelo método 2^{-Cq} (Schmittgen; Livak, 2008).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes-alvo relacionados à biossíntese de fucoxantina pela microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

Gene	Sequências dos iniciadores 5' - 3'	Amplicon (pb)	Acesso NCBI
<i>ZEP1</i>	F - GCTGGAGCAAGGGACAAGTT	96	XM_002180202.1
	R - AGCCATCTTCGGTAGCCTGA		
<i>ZEP2</i>	F - ACAAGGAAGGTGGTGTCAAATC	97	XM_002176899.1
	R - AGGATTGTTTCTCCCGCAAAG		
<i>ZEP3</i>	F - TGGTTGGAAGAACGACAAG	93	XM_002178331.1
	R - AGCTCAAATAGGACCAGAGA		
<i>VDE</i>	F - TCCATCGTTTCGTGTCTCTTCC	109	XM_002178607.1
	R - GTCGTCCCGTACAGGTGTTAAT		
<i>VDL1</i>	F - GAGTGACAAGGAACTCGATATG	100	XM_002180599.1
	R - GATCATGTGTTTCGGTGAGAG		
<i>VDL2</i>	F - GCTACGCATGGATGTGGAAT	101	XM_002180015.1
	R - CTTCGCCGCTGACAAGAAT		

3.3.10 Análises estatísticas

Os dados foram testados quanto à homogeneidade de variância (Teste de Levene) e normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) empregando o software Statistica 7,0. Foi aplicado o teste paramétrico One-way ANOVA (post-hoc de Tukey) para calcular as diferenças de um mesmo tratamento ao longo do tempo de cultivo e também para determinar as diferenças entre diferentes tratamentos em um mesmo período específico. Foi empregado o software GraphPad Prism 9.0 para construção dos gráficos e as diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$. Todos os dados dos parâmetros fisiológicos e moleculares estão apresentados como a média de cada tratamento ($n=3$) \pm desvio-padrão.

3.3 RESULTADOS

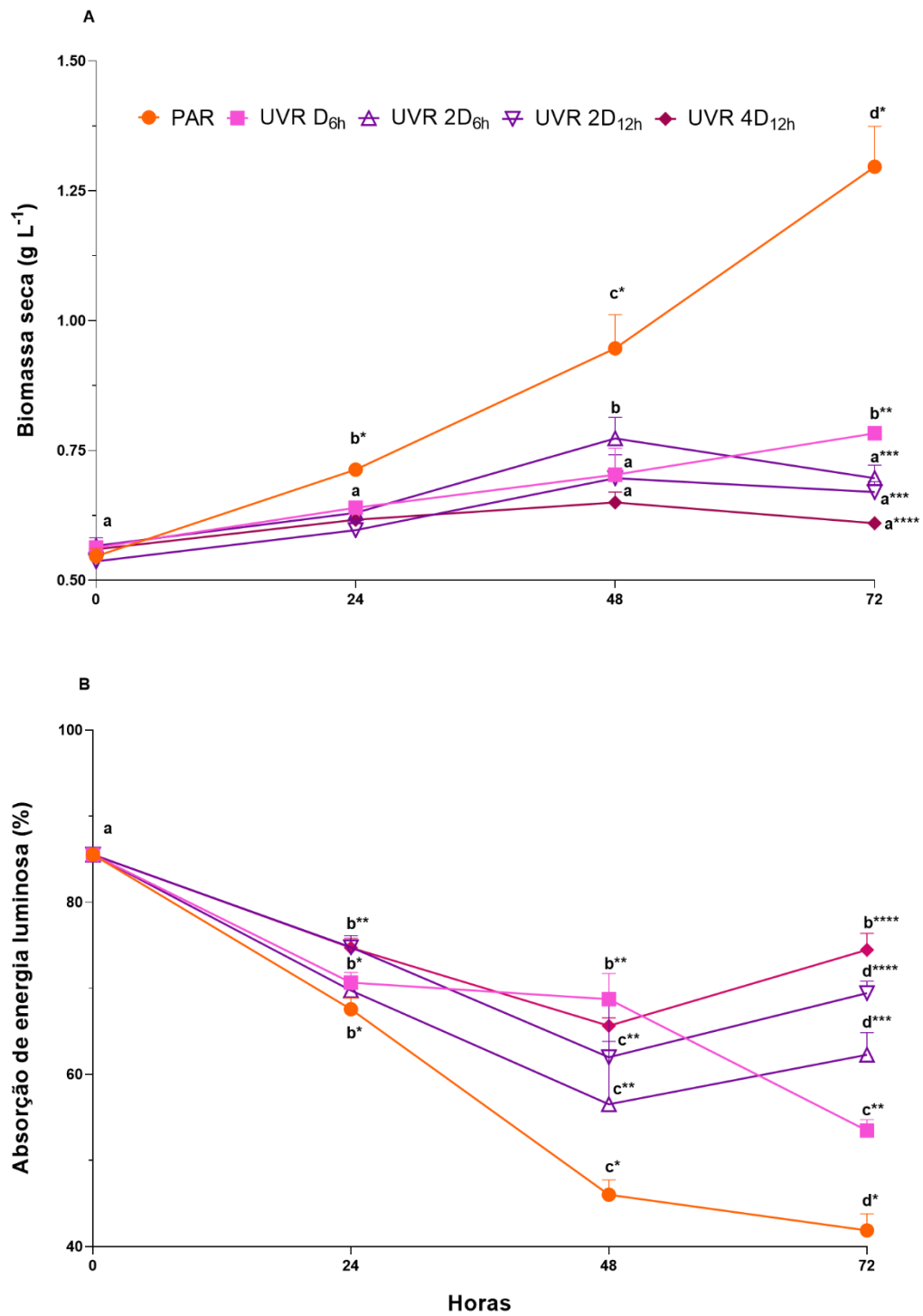
3.3.1 Biomassa e absorção da luz

As culturas de *Phaeodactylum tricornutum* foram aclimatadas durante 7 dias e depois foram expostas à radiação UVR em diferentes quantidades de energia luminosa em um período de 72 horas. Na Figura 3A é apresentado o efeito dessas diferentes exposições no acúmulo de biomassa. As células de *P. tricornutum* foram influenciadas significativamente pela dose de UVR ao longo do tempo e em relação à PAR (grupo controle). Ao longo do tempo, o grupo controle demonstrou um aumento progressivo ($p < 0,05$) na concentração de biomassa seca, atingindo $1,30 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ em 72 horas, cerca de 2,4 vezes maior que no tempo zero. O tratamento com UVR na menor dose (D_{6h}), apresentou um padrão de crescimento menor em relação ao PAR,

atingindo uma concentração de biomassa de $0,78 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, enquanto o dobro da dose com o mesmo tempo de exposição à UVR ($2D_{6h}$) atingiu um valor de $0,70 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, também em 72 horas. Os tratamentos com maior tempo de exposição a UVR ($2D_{12h}$ e $4D_{12h}$) apresentaram menores valores, alcançando $0,67 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ e $0,61 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Quando os tratamentos foram comparados dentro de cada período específico, nota-se novamente um aumento no acúmulo de biomassa para o tratamento PAR em 24 horas, alcançando uma biomassa de $0,71 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, quando comparados com os tratamentos expostos à UVR ($0,62 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$). Em 48 horas, a diferença entre o grupo controle foi mais significativa ($p < 0,05$), atingindo cerca de 1,35 vezes mais biomassa em comparação aos tratamentos com exposição à UVR. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com a mesma dose de UVR ($2D_{6h}$ e $2D_{12h}$), porém o tratamento com maior dose de UV ($4D_{12h}$), não apresentou um crescimento significativo ao longo das 72 horas de cultivo.

Em relação à absorção de luz pelas células de *P. tricornutum* (Fig. 3B), cerca de 85% da luz permaneceu sendo absorvida pelas culturas no tempo zero em uma biomassa inicial de $0,55 \text{ g L}^{-1}$. Foi observado uma limitação na absorção do tratamento com PAR, atingindo 41,88% nas 72 horas de cultivos. O tratamento com a menor dose e com o dobro de UVR (D_{6h} e $2D_{6h}$) no mesmo tempo de exposição também apresentaram uma queda significativa ($p < 0,05$) na absorção de energia luminosa, atingindo 53,47% e 62,29 % no mesmo intervalo de tempo. Por outro lado, as doses de UVR no maior tempo de exposição ($2D_{12h}$ e $4D_{12h}$) apresentaram valores relativamente altos (69,45 e 74,46%, respectivamente) em relação à porcentagem inicial. Em 24 horas de exposição, as taxas de absorção dos tratamentos $2D_{12h}$ e $4D_{12h}$ continuaram mais altas em relação PAR, com valores próximos a 75%. Novamente não houve diferença significativa entre os tratamentos que receberam a mesma dose de UVR ($2D_{6h}$ e $2D_{12h}$).

Figura 3. Acúmulo de biomassa (A) e absorção de energia luminosa (B) em culturas de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).



As letras minúsculas representam diferenças de um mesmo tratamento ao longo do tempo. Os asteriscos representam as diferenças entre os tratamentos dentro de um período de tempo específico. Cada valor está apresentado como a média \pm desvio-padrão ($n=3$).

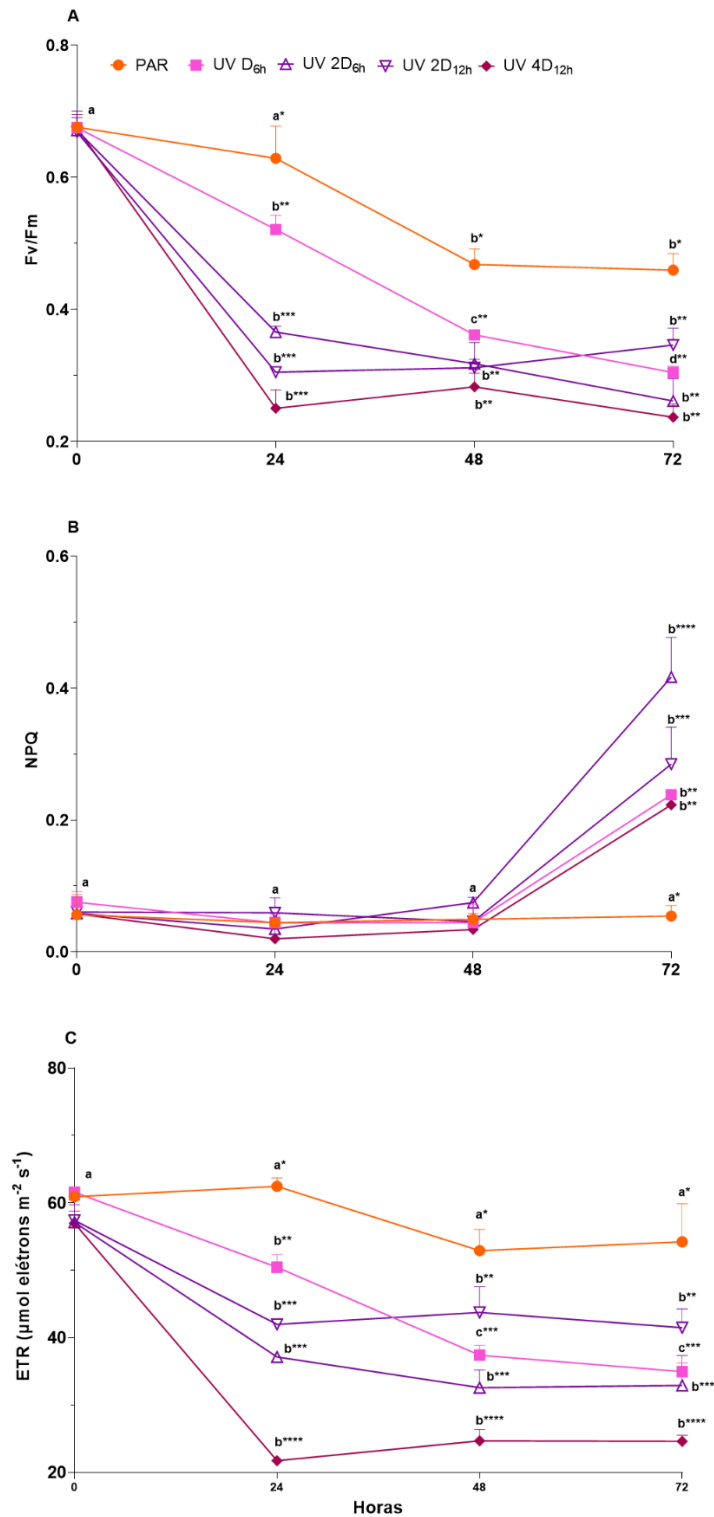
3.3.2 Medições da fluorescência da clorofila-*a* no PSII

Como pode ser visto na Figura 4A, todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) no rendimento quântico máximo do PSII em *P. tricornutum* ao longo das 72 horas. Todos os tratamentos começaram com valores de F_v/F_m próximos a 0,7, indicando que as culturas não estavam estressadas no início do experimento. Nas primeiras 24 horas de cultivo, é possível observar uma queda acentuada nas maiores doses de exposição à UVR, com valores entre $0,25 \pm 0,04$ e $0,37 \pm 0,06$. O tratamento sem exposição à UVR se manteve similar ao início do experimento, mantendo o F_v/F_m em $0,63 \pm 0,02$. A menor dose de UVR (D_{6h}) também apresentou uma redução mais lenta em 24 horas, atingindo um valor de $0,52 \pm 0,03$. Entre 48 e 72 horas de cultivo, o tratamento PAR teve uma redução de 32% desde o início do experimento, enquanto a menor dose de exposição (D_{6h}) atingiu valores entre $0,30 \pm 0,02$ e $0,36 \pm 0,03$, os quais foram alcançados pelas doses mais altas de UVR nas primeiras 24 horas de cultivo. Ainda assim, esses tratamentos submetidos às maiores doses de UVR, mantiveram os valores de F_v/F_m bem reduzidos ao longo de todo o experimento, indicando um estresse fotossintético contínuo.

Em relação ao mecanismo de dissipação de energia (NPQ, Fig. 4B), não houve diferença significativa ao longo do tempo para a PAR. Em 48 horas de cultivo, também não houve diferenças significativas para os tratamentos submetidos às diferentes doses de UVR, tanto ao longo do tempo, quanto em relação à PAR. As maiores respostas foram encontradas em 72 horas para os tratamentos com UVR, onde as doses D_{6h} , $2D_{12h}$ e $4D_{12h}$ apresentaram valores entre $0,23 \pm 0,02$ e $0,28 \pm 0,02$ enquanto a dose $2D_{6h}$ alcançou praticamente o dobro de dissipação de energia.

A taxa de transporte de elétrons (ETR) representada pela Figura 4C, mostra uma diminuição gradual e constante do PAR ao longo do tempo, atingindo uma taxa de 62% em 72 horas. As culturas submetidas às radiações UVR apresentaram uma redução do ETR, atingindo 38% para a dose D_{6h} e sem diferenças significativas entre os tratamentos que receberam a mesma dose de UVR com 35% para $2D_{6h}$ e 37% para $2D_{12h}$, independente da intensidade de radiação. Além disso, o menor valor de ETR foi alcançado pela maior dose de radiação UVR, com 29%.

Figura 4. Parâmetros de fluorescência como Fv/Fm (A), NPQ (B) and ETR (C) em culturas de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas sob exposição à PAR (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação (D = 378 KJ m^{-2}).



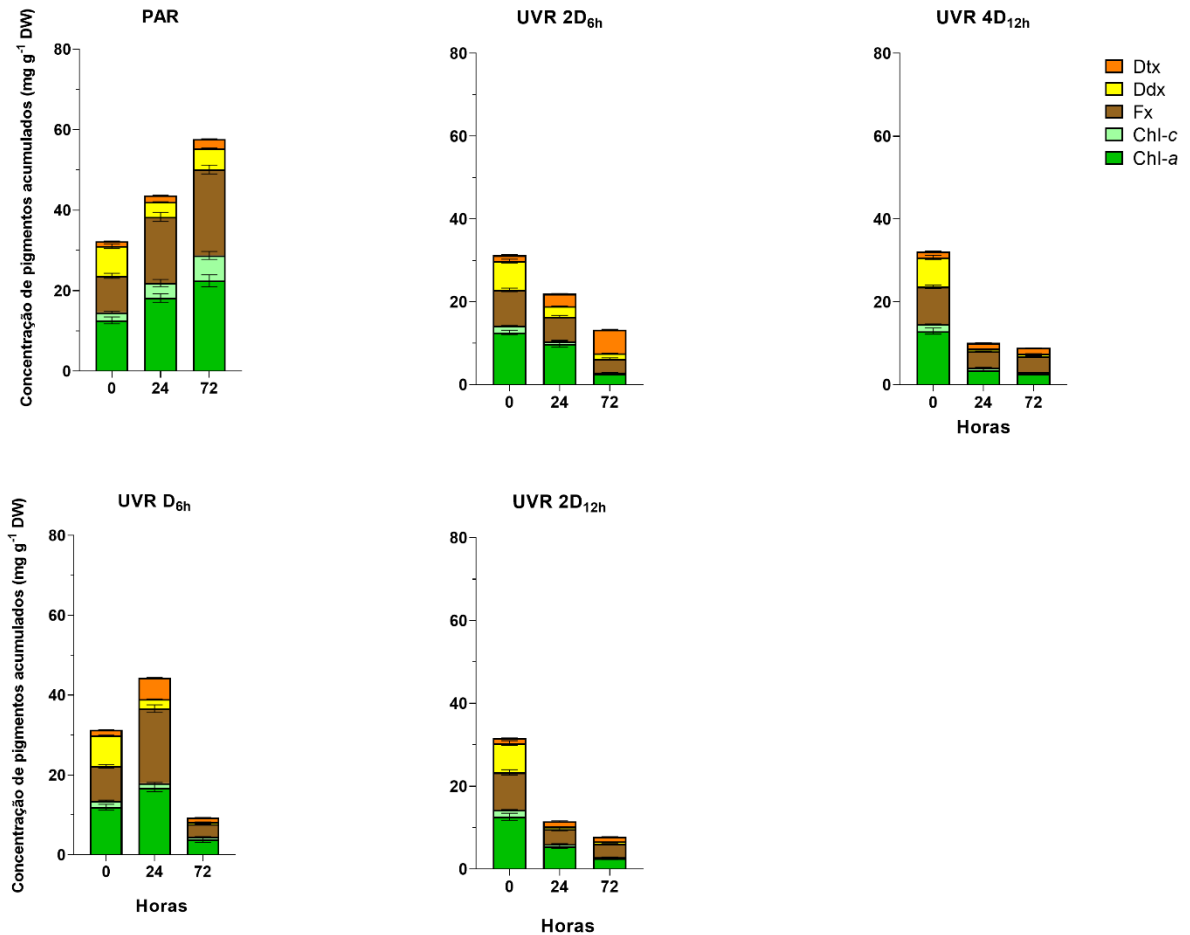
As letras minúsculas representam diferenças de um mesmo tratamento ao longo do tempo. Os asteriscos representam as diferenças entre os tratamentos dentro de um período de tempo específico. Cada valor está apresentado como a média \pm desvio-padrão (n=3).

3.3.3 Teor de pigmentos fotossintetizantes

A concentração de pigmentos nas células de *P. tricornutum* variou expressivamente ($p < 0,05$) em todos os tratamentos conforme apresentado na Figura 5. Os teores de Chl-*a* e Fx aumentaram significativamente ($22,44 \pm 1,09$ e $21,34 \pm 1,11$ mg g⁻¹) no decorrer das 72 horas quando submetidas à PAR. Em relação as culturas expostas a radiação UVR, somente a menor dose (D_{6h}) apresentou um aumento no teor de Chl-*a* e Fx similares à PAR nas primeiras 24 horas de cultivo, atingindo valores de $16,76 \pm 0,88$ e $18,66 \pm 0,96$ mg g⁻¹, respectivamente. Todos os outros tratamentos expostos à UVR apresentaram uma queda brusca na concentração destes pigmentos envolvidos no processo de captação de luz. Da mesma maneira, o teor de Chl-*c*, que também faz parte do complexo proteico FCP em *P. tricornutum*, apresentou um aumento gradativo ao longo do tempo para PAR e um aumento de 50% nas primeiras 24 horas para o tratamento com a menor dose de UVR, porém com uma redução de 80% em 72 horas. Todos os tratamentos com maior tempo de exposição às doses UVR apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) de 80% para Chl-*a* e Fx, e de 65% para Chl-*c* ao longo do tempo.

Com relação a Ddx e Dtx, é possível observar uma relação de interconversão entre estes dois carotenoides que desempenham um papel fundamental no ciclo das xantofilas. A concentração de Ddx em 72 horas para a PAR foi de $5,23 \pm 0,48$ mg g⁻¹, enquanto para os tratamentos expostos à UVR, menores concentrações foram encontradas nos tratamentos D_{6h} ($0,51 \pm 0,02$ mg g⁻¹), 2D_{12h} ($0,52 \pm 0,01$ mg g⁻¹) e 4D_{12h} ($0,62 \pm 0,04$ mg g⁻¹), e de $1,33 \pm 0,23$ mg g⁻¹ para a dose 2D_{6h}. Em contrapartida, os valores de Dtx foram o inverso, apresentando concentrações de $2,35$ mg g⁻¹ para a PAR e um aumento significativo ($p < 0,05$) de para todos os tratamentos expostos à UVR, alcançando teores de $1,14 \pm 0,16$; $5,70 \pm 0,34$; $1,17 \pm 0,04$ e $1,39$ mg g⁻¹ $\pm 0,32$ para as doses D_{6h}, 2D_{6h}, 2D_{12h} e 4D_{12h}, respectivamente.

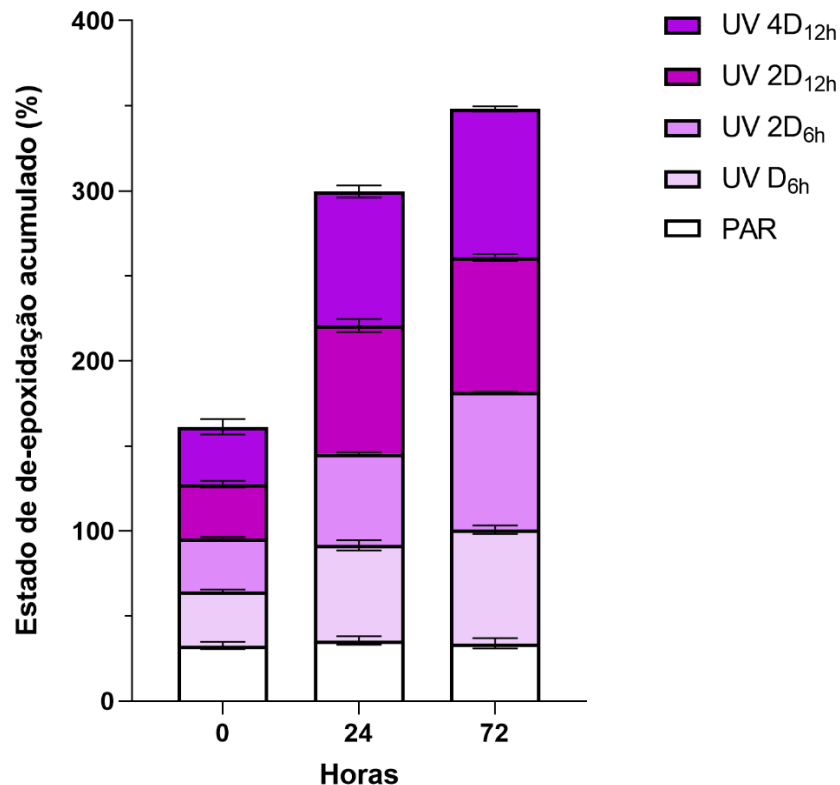
Figura 5. Concentração de clorofila-a (Chl-a), clorofila-c (Chl-c), Diadinoxantina (Ddx), diatoxantina (Dtx) e Fucoxantina (Fx) em culturas de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).



Cada valor está apresentado como a média \pm desvio-padrão (n=3).

O estado de de-epoxidação (DES, Figura 6) apresentou um padrão constante para as culturas submetidas somente à PAR ao longo do período experimental, com uma redução de apenas 11% do início do cultivo. Já os tratamentos expostos à UVR, é possível notar uma maior taxa de de-epoxidação em todas as culturas expostas, com um aumento significativo ($p < 0,05$) de 43% para as doses D_{6h} e 2D_{6h}, e 57% para a maior dose (4D_{12h}) em 72 horas, o que induz há uma rápida conversão de Ddx em Dtx como uma necessidade para fotoprotéger o aparelho fotossintético.

Figura 6. Estado de de-epoxidação (DES) em culturas de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas sob exposição à PAR ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação ($D = 378 \text{ KJ m}^{-2}$).



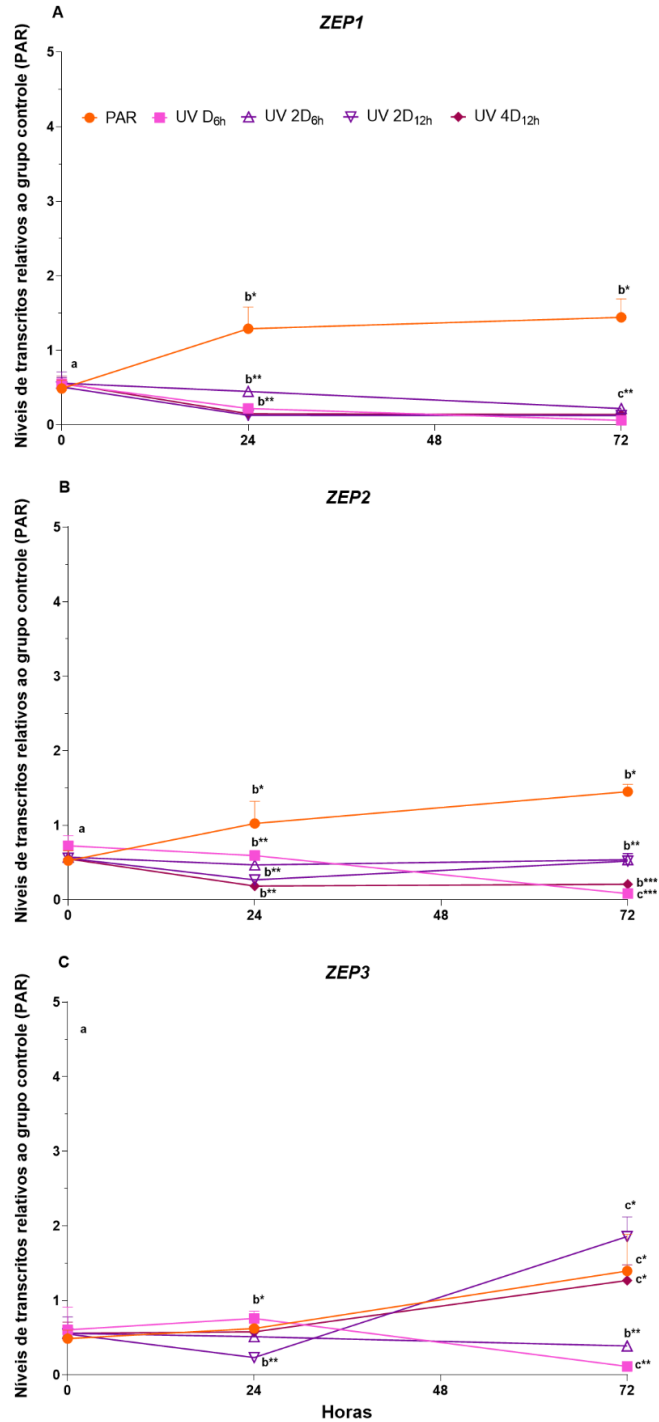
Cada valor está apresentado como a média \pm desvio-padrão ($n=3$).

3.3.4 Nível de transcritos dos genes envolvidos no ciclo Ddx-Dtx

A fucoxantina é o principal pigmento acessório de captação de luz em diatomáceas, produzida principalmente através da diadinoxantina, a qual pode ser de-epoxidada para diatoxantina em condições de alta luminosidade ou exposição à UVR, como proteção contra danos fotossintéticos. Na primeira categoria, que inclui os genes *ZEP1*, *ZEP2* e *ZEP3* (Fig. 7A, 7B e 7C), um padrão similar foi observado para as isoformas *ZEP1* e *ZEP2* em um aumento no nível de transcritos das culturas cultivadas somente na PAR, variando cerca de 2,6 vezes e 2,9 vezes nos tempos 24 e 72 horas, respectivamente. Para as culturas expostas à UVR, as doses de energia luminosa apresentaram uma redução de 60% (D_{6h}), 75% ($2D_{6h}$ e $2D_{12h}$) e 90% ($4D_{12h}$) nos níveis de transcritos em 72 horas. Já o gene *ZEP3*, apresentou um padrão diferente em relação às outras duas isoformas. Em 24 horas, todos os tratamentos tiveram uma redução acentuada nos níveis de transcritos, com um leve aumento em 72 horas somente para as doses com maior tempo de exposição à UVR e à PAR. Na segunda categoria, que inclui os genes *VDE*, *VDL1* e *VDL2* (Fig. 8A, 8B e 8C), as isoformas *VDE* e *VDL1* também apresentaram um

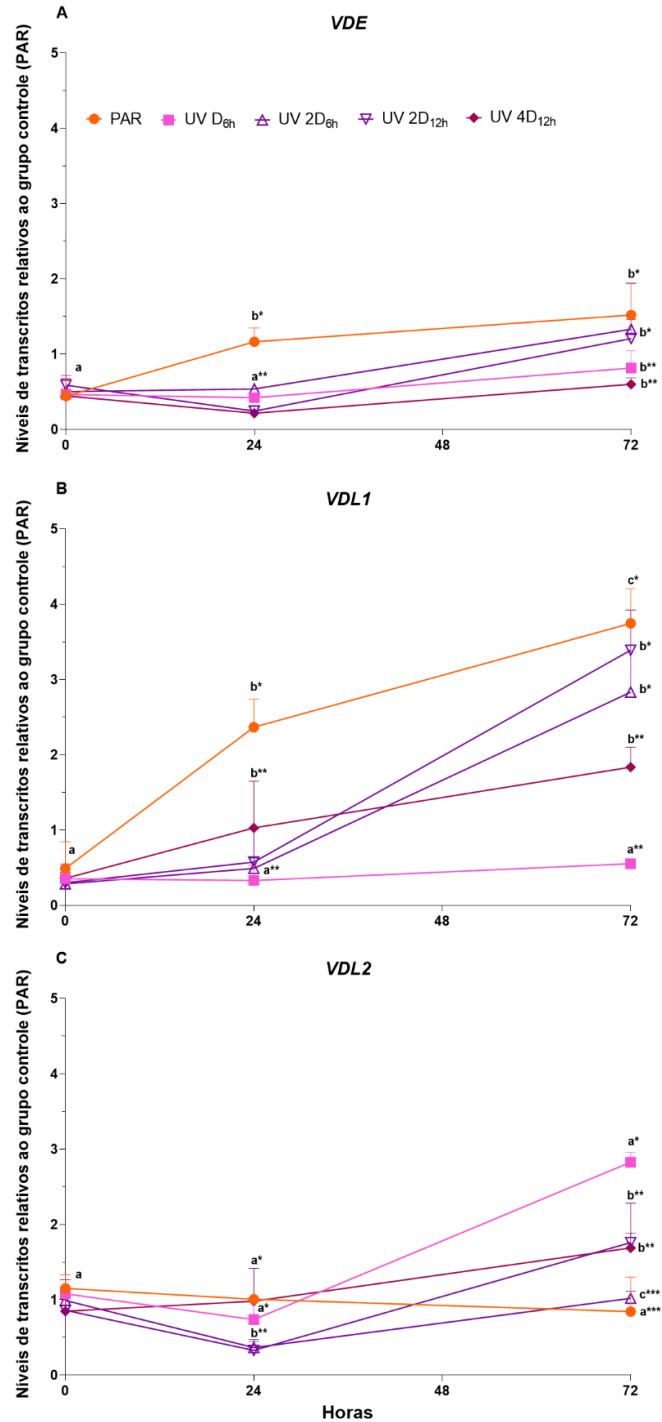
padrão similar no tratamento PAR, com o gene *VDL1* sendo mais regulado. É possível observar um aumento no nível de transcritos dos tratamentos que receberam a mesma dose de UVR, atingindo cerca de 9 vezes para a dose 2D_{12h} e 10 vezes para a dose 2D_{6h}, ambas em 72 horas. Por outro lado, não houve diferença significativa para o tratamento submetido à menor dose. Já a regulação do gene *VDE* comparado ao *VDL1* foi 80% menor. A terceira isoforma desta segunda categoria de genes, apresentou um padrão inverso aos genes *VDE* e *VDL1*, com relação a menor dose de UV (D_{6h}), alcançando um aumento significativo ($p < 0,05$) de 3,5 vezes nos níveis de transcritos, quando comparado com as outras isoformas. O mesmo se aplica na maior dose de UV (4D_{12h}), com um aumento de 2,8 vezes em relação ao *VDL1*. Apesar das diferenças apresentadas entre as isoformas de ambas as categorias, é possível observar uma relação de interconversão entre as isoformas *ZEP1* e *ZEP2* com *VDE* e *VDL1*, e entre *ZEP3* com *VDL2*, assim como ocorre entre a *Ddx* e *Dtx*.

Figura 7. Níveis de transcritos dos genes associados à epoxidação *ZEP1* (A), *ZEP2* (B), *ZEP3* (C) em culturas de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas sob exposição à PAR (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação (D = 378 KJ m^{-2}).



As letras minúsculas representam diferenças de um mesmo tratamento ao longo do tempo. Os asteriscos representam as diferenças entre os tratamentos dentro de um período de tempo específico. Cada valor está apresentado como a média \pm desvio-padrão (n=3).

Figura 8. Níveis de transcritos dos genes associados à de-epoxidação *VDE* (A), *VDL1* (B), *VDL2* (C) em culturas de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas sob exposição à PAR (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e UVR em diferentes doses de radiação (D = 378 KJ m^{-2}).



As letras minúsculas representam diferenças de um mesmo tratamento ao longo do tempo. Os asteriscos representam as diferenças entre os tratamentos dentro de um período de tempo específico. Cada valor está apresentado como a média \pm desvio-padrão (n=3).

3.4 DISCUSSÃO

Os danos ao aparato fotossintético estão relacionados principalmente aos efeitos de estresse causados pela exposição à UVR, tanto pela dose quanto pelo tempo de exposição a essa radiação, afetando o crescimento e a sobrevivência das células de *P. tricornutum*. De acordo com Hendrik *et al.* (2009), dois dos principais alvos desse dano são o complexo do centro de reação do PSII e a enzima Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase/Oxigenase (Rubisco), a qual ativa a função carboxilase durante o Ciclo de Calvin-Benson para a fixar o carbono proveniente do CO₂. Dentro desse contexto, a exposição às diferentes doses de UVR pode ter causado danos à estrutura e à atividade da Rubisco, comprometendo a eficiência da fixação de carbono, corroborando com os resultados de crescimento encontrados nesse estudo. Isso resulta numa diminuição da eficiência fotoquímica da fotossíntese, onde menos energia luminosa é convertida em energia química, criando um desequilíbrio e aumentando o acúmulo de energia luminosa, assim como reportado por Gao *et al.* (2018).

Embora a radiação PAR tenha promovido o crescimento em condições favoráveis, a adição de UVR, especialmente em doses mais altas e em períodos prolongados, dificultou o crescimento nesse estudo, corroborando com os resultados encontrados por Gao *et al.* (2007). Um ponto interessante nos resultados apresentados, foi o crescimento contínuo, mesmo que mínimo, na menor dose de UVR (D_{6h}), diferente dos outros tratamentos expostos a essa radiação. Dentro desse contexto, sugere-se que o autossombreamento, fenômeno onde as células fazem sombra umas às outras, possa ter protegido as células de *P. tricornutum* de um potencial dano, o que não foi observado nas maiores doses de UVR, conforme os resultados de Gao *et al.* (2021). Além disso, as taxas mais altas de absorção de energia luminosa observadas nas doses de UVR mais intensas, também podem estar associadas ao menor crescimento dessas culturas.

Conforme Halac *et al.* (2009) e Lepetit *et al.* (2022), a radiação UVR é conhecida por afetar negativamente o Fv/Fm, causando danos ao PSII e resultando em estresse oxidativo. Desta maneira, as células que foram submetidas às maiores doses de UVR dependem do ciclo Ddx-Dtx e do NPQ como um mecanismo fotoprotetor para a regulação do PSII. A redução do Fv/Fm durante as exposições a curto prazo com UVR, pode estar associada principalmente à saturação do NPQ, gerando um impacto direto no PSII. Esta redução geralmente está relacionada como um indicador de fotoinibição e que afeta diretamente a eficiência máxima da fotossíntese. Nossos resultados também mostraram uma redução gradual ao longo das 72 horas na ETR das culturas expostas à UVR. Isto reforça o impacto nocivo no desempenho fotossintético de *P. tricornutum*, assim como evidenciado pelo Fv/Fm. Por outro lado, é

possível observar que nas culturas submetidas somente à radiação PAR, o NPQ e o ETR permanecem constantes ao longo de todo o período experimental, o que pode indicar um equilíbrio entre a absorção e a dissipação de energia luminosa.

A resposta do ciclo Ddx-Dtx ao estresse à UVR pode depender do tempo de exposição e da aclimação das células, ou seja, ao longo do tempo, as células podem alternar entre diferentes mecanismos de fotoproteção, incluindo a ativação do ciclo dessas xantofilas. Os resultados desse trabalho sugerem que uma exposição curta, mas intensa, à UVR pode induzir uma maior de-epoxidação. Por outro lado, em doses mais baixas de UVR, observou-se uma rápida produção de Ddx, resultando numa menor regulação nos níveis de transcritos. Isso pode indicar que as células estão se aclimatando à menor intensidade de UVR, acelerando a formação desses pigmentos fotoprotetores, assim como reportado por Brunet *et al.* (2011).

A interconversão entre Ddx e Dtx mediada pelas isoformas *ZEP1*, *ZEP2*, *VDE* e *VDL1*, assim como a associação entre *ZEP3* e *VDL2*, refletiu em um mecanismo chave de fotoproteção, especialmente em condições de exposição à UVR. Esses resultados são consistentes com Nymark (2009), Kim *et al.* (2019) e Cella *et al.* (2023), que também discutem a importância dessa interconversão dinâmica como uma estratégia de fotoproteção, realçando a capacidade aclimatativa de *P. tricornutum* em condições variáveis.

Halac *et al.* (2009), por exemplo, relataram uma estimulação na de-epoxidação de Ddx em resposta à UVR, que apresentou maior redução na eficiência do PSII quando correlacionada com maiores quantidade de energia luminosa. Entretanto, os mesmos autores concluíram que as células aclimatadas com pouca energia luminosa não exibiram efeitos significativos na de-epoxidação desse carotenoide, embora a redução na eficiência do PSII tenha sido notável. Os efeitos da UVR na de-epoxidação podem estar relacionados a diversos fatores, além da intensidade luminosa e do espectro UVR. Embora o aumento da de-epoxidação possa ser uma resposta aclimatativa para proteger o fotossistema contra os efeitos prejudiciais da UVR, essa de-epoxidação pode não ser suficiente para proteger completamente o aparato fotossintético. Outros fatores como o estresse oxidativo e a permeabilidade das membranas tilacóides, também podem desempenhar um papel na regulação dos pigmentos fotoprotetores (RASTOGI *et al.*, 2020).

A aparente contradição nas conclusões dos estudos sobre o ciclo Ddx-Dtx em resposta à radiação UVR pode ser esclarecida quando se consideram as condições específicas em que esses trabalhos foram realizados. Por um lado, é relatado uma estimulação positiva do ciclo Ddx-Dtx, que geralmente foram realizados sob condições espectrais que se assemelham às condições naturais, o que inclui um equilíbrio espectral entre à PAR, à UVR (UV-A) e à UVR

(UV-B). Esses estudos geralmente expõe os organismos a níveis relativamente baixos de UV-B e níveis mais altos de UV-A (REIZOPOULOU *et al.*, 2000; ZUDAIRE; ROY, 2001; WULFF *et al.*, 2008; HENDRIK *et al.*, 2009; HALAC *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2021), o que corrobora com o espectro de radiação UVR deste trabalho. Por outro lado, outros estudos presentes na literatura (WARING *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2017) relatam que a inibição do ciclo Ddx-Dtx muitas vezes foi conduzida sob condições espectrais desfavoráveis, como por exemplo a ausência da radiação UV-A, o que não representa de fato as condições ambientais naturais.

Além do mais, os resultados desse estudo mostraram também uma resposta diferenciada de *P. tricornutum* com um aumento da concentração dos pigmentos envolvidos no processo de captação de luz dependendo da dose ou tempo de exposição à PAR e UVR. Estes resultados, sugerem que, enquanto a radiação PAR promove a fotossíntese e a síntese de pigmentos, a UVR afeta a composição bioquímica da biomassa, impactando diretamente a eficiência fotossintética e a estrutura dos complexos proteicos associados. No entanto, baixas doses de UVR podem inicialmente estimular a produção de pigmentos, como a Chl-*a* e a Fucoxantina por exemplo, enquanto as exposições mais intensas ou prolongadas de UVR apresentaram um efeito inibitório. Essa compreensão é fundamental para elucidar os mecanismos de resposta e aclimação das diatomáceas à diferentes doses de energia luminosa, ressaltando a complexidade das estratégias fotoprotetoras desses organismos em ambientes naturais variáveis.

3.5 CONCLUSÕES

Este capítulo fornece evidências claras do impacto nocivo da radiação UVR em vários aspectos fisiológicos e moleculares de *Phaeodactylum tricornutum*, dentre eles:

- As células de *P. tricornutum* foram significativamente afetadas pela dose de UVR, com um padrão de crescimento reduzido em comparação às culturas expostas apenas à PAR. Isso pode ser um indicativo de que a UVR apresenta um efeito inibitório no crescimento celular, especialmente em doses mais altas e em tempos de exposição prolongados;
- Foi observada uma limitação na absorção de luz em tratamentos com UVR, indicando uma possível degradação ou inibição dos componentes do aparato fotossintético. A eficiência fotossintética, medida através do rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm), também diminuiu significativamente sob UVR, sugerindo danos ao PSII e estresse fotossintético;

- A exposição prolongada à UVR resultou em uma diminuição significativa na concentração de pigmentos importantes como Chl-*a*, Chl-*c* e Fucoxantina. Este declínio foi particularmente notável em tratamentos com doses mais intensas de UVR, ressaltando o efeito prejudicial dessa radiação na produção e manutenção desses pigmentos essenciais para a captação de luz durante o processo de fotossíntese;
- O estado de de-epoxidação dos carotenoides associados ao NPQ, como a conversão de Ddx para Dtx, mostrou uma taxa maior de de-epoxidação em tratamentos com UVR. Isso implica em uma tentativa de aumentar a capacidade de fotoproteção em resposta ao estresse em culturas submetidas à exposição de UVR, indicando a ativação de mecanismos de defesa celular;
- A transcrição dos genes relacionados ao ciclo das xantofilas, incluindo a redução nos níveis de transcritos dos genes *ZEP1*, *ZEP2*, *ZEP3* e o aumento no nível de transcritos dos genes *VDE*, *VDL1* e *VDL2* foi afetada pela radiação UVR, sugerindo uma modificação na capacidade da célula de responder ao estresse luminoso e fotoprotetor.

3.6 REFERÊNCIAS

- ANDREASSON, K. I. M.; Wängberg, S. Reduction in growth rate in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) and *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) induced by UV-B radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 3, p. 227-233, 2007.
- BLOMMAERT, L.; CHAFAI, B.; BAILLEUL. The fine-tuning of NPQ in diatoms relies on the regulation of both xanthophyll cycle enzymes. **Scientif Reports**, v. 11, p. 1-16, 2021.
- BRUNET, C. *et al.* Pigments and photoacclimation processes. **Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography**. Cambridge University Press, 2011, p. 445-471.
- CELLA, H. *et al.* PAR regulation of photoprotection in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): Roles of doses and irradiances. **Journal of Applied Phycology**, v. 35, p. 2177–2191, 2023.
- ENRÍQUEZ S.; BOROWITZKA, M. A. The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae. In: SUGGETT, D.J; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M.A. (eds) **Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications**. Springer, Dordrecht, 2010, p. 187–208.

GAO, G. *et al.* Increased CO₂ exacerbates the stress of ultraviolet radiation on photosystem II function in the diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 156, p. 96-105, 2018.

GAO, G. *et al.* Ultraviolet Radiation Stimulates Activity of CO₂ Concentrating Mechanisms in a Bloom-Forming Diatom Under Reduced CO₂ Availability. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 651567, 2021.

GOSS, R.; LEPETIT, B. Biodiversity of NPQ. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 13-32, 2015.

GUILLARD R. R.; RYTHER J. H. Studies of marine planktonic diatoms .I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran Can. **Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 229-239, 1962.

HALAC, S. R. *et al.* Photochemical responses of three marine phytoplankton species exposed to ultraviolet radiation and increased temperature: Role of photoprotective mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 217-227, 2014.

JIN, P., *et al.* Long-term adaptation to elevated temperature but not CO₂ alleviates the negative effects of ultraviolet-B radiation in a marine diatom. **Marine Environmental Research**, v. 186, p. 105929, 2023.

KIM, M.; KANG, Y.; JIN, E. Gene Expression Analysis of Zeaxanthin Epoxidase from the Marine Microalga *Dunaliella tertiolecta* in Response to Light/Dark Cycle and Salinity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1453-1459, 2019.

LEPETIT, B. *et al.* Photosynthetic light reactions in diatoms. ii. the dynamic regulation of the various light reactions. **The molecular life of diatoms**, Springer International Publishing, 2022, p.423-464.

MALAPASCUA, J. R. F. *et al.* Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. **Aquatic Biology**, v. 22, p. 123-140, 2014.

HENDRIK, W. P.; BUMA, A. G. J. Does ultraviolet radiation affect the xanthophyll cycle in marine phytoplankton? **Photochemical and Photobiological Sciences**, p. 1295-1301, 2009.

RASTOGI, R. *et al.* Resilience and self-regulation processes of microalgae under UV radiation stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 43, p. 100322, 2020.

REIZOPOULOU, S. *et al.* UV effects on invertebrate and diatom assemblages of Greece. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 56, n. 2-3, p. 172-180, 2000.

RHINN, H.; SCHERMAN, D.; ESCRIOU, V. One-step quantification of single-stranded DNA in the presence of RNA using Oligreen in a real-time polymerase chain reaction thermocycler. **Analytical Biochemistry**, v. 372, p. 116-118, 2008.

RUBAN, A. V. *et al.* The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. **Photosynthesis Research**, v. 82, p. 165–175, 2004.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SCHMITZ, C. *et al.* Monitoring the stability of the xanthophyll fucoxanthin in microalga and seaweed biomasses, and extracts stored at low temperatures. **Research Society and Development**, v. 11, p. e577111537712, 2022.

STANCHEVA, R.; LOWE, R. Diatom symbioses with other photoautotroph. In SECKBACH, J.; GORDON, R. (eds), **Diatoms—fundamentals and applications**, Wiley, Beverly MA 2019, p. 225–244.

STRICKLAND, J. D.; PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Pigment analysis. **Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids**. Fish Resource Building, Canada Bulletin, 1972, p. 185-199.

TUCHIN, V. V. Tissue Optics and Photonics: Biological Tissue Structures. *Journal of Biomedical Photonics and Engineering*, v.1, n.1, p. 1-21, 2015.

WARING, J.; UNDERWOOD, G. J. C.; BAKER, N. R. Impact of elevated UV-B radiation on photosynthetic electron transport, primary productivity and carbon allocation in estuarine epipelagic diatoms. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 4, p. 521-534, 2005.

ZUDAIRE, L.; ROY, S. Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 62, n. 1-2, p. 26-34, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

Esta tese forneceu um melhor conhecimento sobre os impactos ecológicos das variações das condições de luz em ambientes aquáticos. Elucida como as quantidades de energia luminosa proveniente da PAR e da UVR afetam o crescimento, a fotossíntese e as respostas moleculares em *Phaeodactylum tricornutum*, aprimorando a compreensão dos papéis ecológicos e das respostas adaptativas das diatomáceas às mudanças nas condições ambientais. Esta investigação detalhada contribui significativamente para o campo da fotobiologia e pesquisa em microalgas, oferecendo informações valiosas sobre a resiliência e adaptabilidade dessa microalga diante dos estressores ambientais.

Um fator interessante a ser considerado nos resultados do Capítulo 3 se diz respeito ao acúmulo de fucoxantina durante as primeiras 24 horas para o tratamento com a menor dose de UVR (D_{6h}), o qual foi alcançado um teor de $11,94 \pm 0,01$ mg de fucoxantina, muito parecido com o tratamento controle (PAR), o qual se obteve um teor de $11,73 \pm 0,01$ mg. Dentro desse contexto, pode-se utilizar uma abordagem estratégica para otimizar a produção de biomassa microalgal e de metabólitos específicos de interesse industrial. O cultivo de microalgas em duas fases, geralmente conhecido como cultivo em duas etapas, tem ganhado destaque devido aos benefícios que oferece em termos de eficiência produtiva e otimização das condições de crescimento. Através da divisão do processo em duas etapas distintas, cada fase é cuidadosamente ajustada para promover o crescimento celular e a acumulação de bioprodutos desejados. No caso do Capítulo 3, a menor dose de UVR se mostrou promissora para estimular um aumento no teor de fucoxantina em *P. tricornutum*. Apesar dos desafios, as vantagens em termos de produtividade, acúmulo direcionado de bioprodutos, sustentabilidade e flexibilidade demonstram um potencial significativo dessa técnica para o futuro da produção de microalgas.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ANDRADE, K. A. M. *et al.* Marine microalgae with anti-cancer properties. **Marine Drugs**, v. 16, n. 165, p. 1-17, 2018.
- ANDREASSON, K. I. M.; Wängberg, S. Reduction in growth rate in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) and *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) induced by UV-B radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 3, p. 227-233, 2007.
- BARSANTI, L. *et al.* Oddities and curiosities in the algal world. In: EVANGELISTA, V.; BARSANTI, L.; FRASSANITO, A. M.; PASSARELLI, V.; GUALTIERI, P. **Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection**. Dordrecht: Springer, 2008, p. 353–391.
- BAUER, C. M. *et al.* In vitro fucoxanthin production by the *Phaeodactylum tricorutum* diatom. **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier, p. 211-242, 2019.
- BORGES, M. *et al.* Integration of consumer-targeted microalgal production with marine fish effluent biofiltration – a strategy for mariculture sustainability. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 3, p. 187-197, 2005.
- BOWLER, C. *et al.* The *Phaeodactylum tricorutum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, p. 239-244, 2008.
- BRODDRICK, J.T. *et al.* Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **New Phytologist**, v. 222, p. 1364-1379, 2019.
- BUNSEN R., ROSCOE, H. Photochemische untersuchungen. **Annalen der Physik**, v. 184, p. 193–273, 1859.
- CELLA, H. *et al.* PAR regulation of photoprotection in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae): Roles of doses and irradiances. **Journal of Applied Phycology**, v. 35, p. 2177–2191, 2023.
- CESSNA, S.; DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS III, W. W. Exploring Photosynthesis and Plant Stress Using Inexpensive Chlorophyll Fluorometers. **Journal of Natural Resources and Life Sciences Education**, v. 39, n. 1, p. 22-30, 2010.
- CHALLABATHULA, D.; ZHANG, Q.; BARTELS, D. Protection of photosynthesis in desiccation-tolerant resurrection plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 227, p. 84-92, 2018.
- CONCEIÇÃO, D. *et al.* The effect of light intensity on the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32 p. 1017-1025, 2020.
- COSTA, B. S. *et al.* Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 483-493, 2013.

- DAMBEK, M. *et al.* Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 15, p. 5607-5612, 2012.
- DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- DUCHÊNE, C. *et al.* Diatom phytochromes integrate the entire visible light spectra for photosensing in marine environments. **BioRxiv**, 2023.
- FALCIATORE, A. *et al.* Diatom molecular research comes of age: model species for studying phytoplankton biology and diversity. **The Plant Cell**, v. 32, p. 547-572, 2020.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. 2022. **The state of world fisheries and aquaculture: Towards blue transformation**, v. 1, 266p. Rome.
- FISHER, N. L., *et al.* Divergence of photosynthetic strategies amongst marine diatoms. **PLoS One**, v. 15, p. 1-27, 2020.
- GELZINIS, A. *et al.* Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1847, n. 2, p. 241-247, 2015.
- HALAC, S.; GARCÍA-MENDOZA, E.; BANASZAK, A. T. *et al.* Ultraviolet Radiation Reduces the Photoprotective Capacity of the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae, Heterokontophyta). **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 3, p. 807-815, 2009.
- JIN, P., *et al.* Long-term adaptation to elevated temperature but not CO₂ alleviates the negative effects of ultraviolet-B radiation in a marine diatom. **Marine Environmental Research**, v. 186, p. 105929, 2023.
- KUCZYNSKA, P.; JEMIOŁA-RZEMINSKA, M.; STRZALKA, K. Photosynthetic pigments in diatoms. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5847-5881, 2015.
- KUCZYNSKA, P. *et al.* The xanthophyll cycle in diatom *Phaeodactylum tricornutum* in response to light stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 152, p. 125-137, 2020.
- LEPETIT, B. *et al.* The diatom *Phaeodactylum tricornutum* adjusts nonphotochemical fluorescence quenching capacity in response to dynamic light via fine-tuned Lhc_x and xanthophyll cycle pigment synthesis. **New Phytologist**, v. 214, p. 205-218, 2017.
- LEPETIT, B. *et al.* (2022) Photosynthetic light reactions in diatoms. ii. the dynamic regulation of the various light reactions. **The molecular life of diatoms**, Springer International Publishing, 2022, p.423-464.
- LIU, Y. *et al.* Fucoxanthin activates apoptosis via inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and suppresses invasion and migration by restriction of p38-MMP-2/9 pathway in human glioblastoma cells. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 10, p. 2728-2751, 2016.

LOHR, M.; WILHELM, C. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 15, p. 8784-8789, 1999.

LOHR, M.; WILHELM, C. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. **Planta**, v. 212, n. 3, p. 382-391, 2001.

LOPES, R. G. *et al.* Effect of phosphorus and growth phases on the transcription levels of EPA biosynthesis genes in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, p. 13-22, 2019.

LOPES, F. G. *et al.* Anti-cancer effects of fucoxanthin on human glioblastoma cell line. **Anticancer Research**, v. 40, n. 12, p. 6799-6815, 2020.

MAGNOTTI, C. *et al.* Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. Part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 8, p. 1-9, 2015.

MALAPASCUA, J. R. F. *et al.* Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. **Aquatic Biology**, v. 22, p. 123-140, 2014.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, J. G.; KOBLIZEK, M. Photosynthesis in microalgae, In: A. Richmond, Q. Hu (Eds.), **Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology**, second ed, Wiley-Blackwell, Oxford, 2013, p. 21-36.

NIKOLAOU, A. *et al.* Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae growth. **Journal of Theoretical Biology**, v. 390, p. 61-72, 2016.

PAJOT, A. *et al.* Light-response in two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*: Evidence for different photoprotection strategies. **Algal Research**, v. 69, p. 102915, 2023.

RIZWAN, M. *et al.* Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

SERÔDIO J.; LAVAUD, J. Diatoms and their ecological importance. In: LEAL, F. W., AZUL, A.M., BRANDI, L., LANGE SALVIA, A., WALL, T. (eds) **Life Below Water**. Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals. Springer, 2020, p. 1–9.

SEYDOUX, C., *et al.* Impaired photoprotection in *Phaeodactylum tricornerutum* KEA3 mutants reveals the proton regulatory circuit of diatoms light acclimation. **New Phytologist**, v. 234 n. 2, p. 578-591, 2022.

SHI, K. *et al.* Impacts of enhanced UVB radiation on photosynthetic characteristics of the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae, Heterokontophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 1287–1296, 2017.

TROELL *et al.* Perspectives on aquaculture's contribution to the Sustainable Development Goals for improved human and planetary health. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 54, n. 2, p. 251-342, 2023.

VALLE, K. C. *et al.* System Responses to Equal Doses of Photosynthetically Usable Radiation of Blue, Green, and Red Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-37, 2014.

TUCHIN, V. V. Tissue Optics and Photonics: Biological Tissue Structures. **Journal of Biomedical Photonics and Engineering**, v.1, n.1, p. 1-21, 2015.

WAGNER, H. *et al.* Photosystem II cycle activity and alternative electron transport in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under dynamic light conditions and nitrogen limitation. **Photosynthesis Research**, v. 128, p. 151-161, 2016.