

Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Relatório sobre a lição:

Novas perspetivas sobre a Árvore da Vida:  
As grandes linhagens evolutivas  
de Eucariontes Unicelulares

por

João Carlos Serafim Varela

Professor Associado

Faro

2024

*Provas de agregação a apresentar à Universidade do Algarve, de acordo com o disposto pelo Decreto-Lei n.º 239/2007 de 19 de junho*

Relatório de lição

João Varela, 2024

*No presente documento, apresenta-se o **sumário pormenorizado da lição** a que se refere a alínea c) do artigo 5º Decreto-Lei nº 239/2007 de 19 de junho para apreciação na prestação de provas para a atribuição do título de Agregado. Esta lição insere-se no ramo de conhecimento de Ciências Biotecnológicas da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade do Algarve.*

*“For 15 years, the eukaryote Tree of Life (eToL) has been divided into five to eight major groupings, known as ‘supergroups’. However, the tree has been profoundly rearranged during this time. The new eToL results from the widespread application of phylogenomics and numerous discoveries of major lineages of eukaryotes, mostly free-living heterotrophic protists. The evidence that supports the tree has transitioned from a synthesis of molecular phylogenetics and biological characters to purely molecular phylogenetics. Most current supergroups lack defining morphological or cell-biological characteristics, making the supergroup label even more arbitrary than before. Going forward, the combination of traditional culturing with maturing culture-free approaches and phylogenomics should accelerate the process of completing and resolving the eToL at its deepest levels.”*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Burki et al. (2020). The new tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **35**: 43-55.

Journalist: “What is a microalga?”

FAO states: “It is a microscopic, motile or non-motile chlorophyll-containing plant.”

Journalist: “Really, microalgae are plants?”

Some random website: “Yes, they are tiny little plants producing highly beneficial compounds for humankind.”

Journalist: “Oh, so you’re not talking about plants, like those green plants. You’re talking about little plants, like... little factories...”

An illuminated scientist responds: “Err... I was talking about them both, but not really, because some of them are not plants.”

Journalist looking confused: “I don’t understand what you mean.”

A young algaeneer intervenes and says: “Never mind, it’s too complicated.” <sup>1</sup>

*1 – Conversa imaginária, mas baseada em definições encontradas na internet, com graus de fiabilidade bem diversos, cujo jogo de palavras só funciona em inglês. Algaeneer = “Algae Engineer”, nome dado aos jovens investigadores do mundo das algas, os quais já têm a sua própria conferência, YAS = Young Algaeneers Symposium.”*

## Índice

### Table of Contents

<b>1. Nota prévia .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Plano da Lição Síntese .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Sumário .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Conteúdos da Lição Síntese .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Recursos e estratégias científico-pedagógicas .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Referências bibliográficas.....</b>	<b>15</b>

## 1. Nota prévia

O desenvolvimento de qualquer projeto biotecnológico deverá se apoiar em bases biológicas sólidas. A biotecnologia de microalgas não é diferente, necessitando de uma estreita interação entre a biologia (molecular), bioquímica e diversas tecnologias para implementar as aplicações desejadas pela indústria e respetivos clientes. Porém, “microalga” é um termo de conveniência que não respeita os grandes grupos (megagrupos) que nos são dados pelo estudo da biologia evolutiva. Por conseguinte, esta lição não se cingirá apenas a eucariontes fotossintéticos, ou seja, às referidas “microalgas”, mas antes focar-se-á nos principais megagrupos de eucariontes que, em geral, são microscópicos e unicelulares, tendo várias linhagens adquirido a capacidade fotossintética por processos de endossimbiose e/ou cleptoplastia.

Nesta lição serão referidos e discutidos os recentes desenvolvimentos da biologia molecular e bioquímica que têm permitido a sua aplicação na elucidação dos grandes grupos de eucariontes unicelulares através da inferência filogenética a nível não só de conjuntos de dados cada vez maiores (que incluem matrizes com mais de 150 genes), como também da comparação a nível genómico. Assim, nesta lição pretende-se dar uma **perspetiva histórica dos sistemas de classificação**, especialmente da dita “árvore da vida dos eucariontes”. Parte-se desde a **classificação dicotómica de Lineu** até à **atual árvore da vida** pelos estudos mais recentes a nível da **filogenia e filogenómica** pelos grupos de investigação de **Patrick Keeling, Alastair Simpson e Fabien Burki**. Finalmente, termina-se com a explicação da importância deste conhecimento e como este pode ser aplicado na biotecnologia de microalgas.

## 2. Plano da Lição Síntese

### 2.1 Sumário

A sistematização da biodiversidade e da sua classificação tem sofrido grandes alterações ao longo do tempo à medida que o conhecimento humano tem evoluído. Inicialmente, baseada principalmente em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, com o advento da biologia molecular e da sequenciação de (meta)genomas e (meta)transcritomas em larga escala, ganharam-se novas perspectivas de como classificar esta biodiversidade. Apesar destas transições do conhecimento biológico e tecnológico, a classificação hierárquica de Lineu é ainda mantida e até expandida, com conceitos de *taxa* mais abrangentes, acima dos reinos, como os “impérios” de Cavalier-Smith e os domínios da vida propostos por Carl Woese. Nesta lição, dá-se inicialmente uma perspectiva histórica dos sistemas de classificação da biodiversidade dos eucariontes, com principal foco nos grandes *taxa*, já que praticamente todos eles incluem organismos unicelulares, comumente designados por “protistas”. Inclui a discussão realizada por Robert Whittaker nas propostas de 2 a 5 reinos e das propostas de Cavalier-Smith de 6 reinos. Esta exposição culmina com a discussão da introdução do conceito de classificação mais cladísticos, que inclui o conceito mais recente de *taxa* sem hierarquia definida designados por “supergrupos”. Passa-se brevemente a explicar a biodiversidade dos supergrupos TSAR, Archaeplastida, Amorphea, Haptista, Criptista e “Excavata”, este último já defunto pela comprovação da sua polifilia. Termina-se com a discussão da importância de se conhecer a história evolutiva dos organismos com que se trabalha para realizar trabalhos de biologia aplicada e biotecnologia.

### 2.2 Objetivos

O principal objetivo desta lição é dar uma perspectiva evolutiva em relação à biodiversidade de microrganismos unicelulares eucarióticos, frequentemente designados por “protistas”. O objetivo final é dar aos alunos em processo de obter o seu grau de doutor ferramentas de melhor entenderem como estes organismos se relacionam uns com os outros e como este conhecimento pode ser aproveitado para prever a sua bioquímica e fisiologia.

## 2.3 Conteúdos da Lição Síntese

### 2.3.1 Perspetiva histórica dos sistemas de classificação da biodiversidade

No seu artigo seminal publicado na revista *Science* em 1969, Robert Whittaker expôs com grande clareza as limitações das classificações até então. Referiu, em primeiro lugar, a classificação naturalista e simplista na divisão da biodiversidade em dois grandes reinos, o Reino Animal e o Reino Vegetal, tal como formulado por Carl Linnaeus (**Whittaker, 1969**). De acordo com esta classificação, os animais corresponderiam a todos os organismos capazes de movimento e ingestão de alimentos e as plantas seriam os organismos não móteis, mas capazes de realizar fotossíntese, obtendo os nutrientes através de raízes. Em geral, o foco deste tipo de classificação naturalista seriam os organismos terrestres macroscópicos. Porém, era evidente que esta classificação dualista levantava vários problemas. Por exemplo, os fungos seriam organismos “vegetais” por não se moverem, havendo quem sugerisse que eles descendiam de algas que tinham perdido a capacidade fotossintética.

Com a descoberta de uma cada vez maior biodiversidade a nível microscópico, esta dualidade foi posta em causa, por exemplo, pela descoberta de organismos flagelados (por ex., *Euglena* e *Dunaliella*), logo móteis, com a capacidade de fotossintetizar, sendo os mesmos organismos, por vezes, classificados como animais por zoólogos e como plantas por botânicos. Assim, foi inicialmente proposto um terceiro reino, designado por “Protoctista” por John Hogg ou “Protista” por Ernst Haeckel, que incluiria estas formas de vida “mais rudimentares” em que no primeiro caso seriam incluídos organismos multicelulares como os fungos e que no segundo caso seriam apenas incluídos organismos unicelulares (**Whittaker, 1969**).

Mais tarde, já no século XX, Herbert Copeland sugeriu um quarto reino designado por *Mychota* ou *Monera*, onde seriam colocados os organismos sem verdadeiro núcleo, isto é, as bactérias e as ditas “algas azul-esverdeadas”. Nesta classificação, “protistas” não fotossintéticos, algas e fungos foram colocados no reino *Protoctista*. No entanto, **Whittaker (1969)** contrapõe que o sistema sugerido por Copeland falha por vários motivos: 1) não tem em conta a trofia dos organismos, nomeadamente fotossíntese para o Reino *Plantae* / *Metaphyta*, ingestão para o Reino *Animalia* / *Metazoa* e absorção para os fungos mais evoluídos; 2) os reinos incluem organismos de diferentes graus de organização celular e diferenciação tecidual, o que conduz a uma definição arbitrária da inclusão de organismos

no Reino *Protoctista* ou nos reinos de organismos mais evoluídos como *Metaphyta* e *Metazoa*; e 3) o Reino *Protoctista* assemelha-se mais a uma confederação de organismos que foram excluídos dos restantes reinos.

Devido a estas objeções, em 1959, Whittaker sugeriu também um sistema de 4 reinos, dando mais ênfase à trofia, em que inclui procariontes e eucariontes mais simples no reino *Protista*. O Reino *Plantae* passa a incluir a maior parte das algas eucarióticas, incluindo as clorófitas e rodófitas, mas exclui algas “mais simples” como as crisófitas, “pirrófitas” (por ex., dinoflagelados e criptófitas) e as euglenófitas, que são classificadas como pertencentes ao Reino *Protista*. Porém, mais tarde, Whittaker sugeriria um refinamento ao seu sistema de classificação de 4 reinos, colocando os procariontes num quinto reino designado por *Monera*.

Porém, Whittaker (1969) já reconhecia que o sistema de cinco reinos apresentava limitações claras e que conduzia a agrupamentos de *taxa* polifiléticos. Além disso, a inclusão das clorófitas no reino *Plantae* violava, precisamente, a definição deste *táxon*, que deveria apenas conter organismos eucariontes multicelulares. Apesar disso, este sistema é ainda o que é ensinado em Biologia aos alunos do 11º ano.

### **2.3.2 Sistemas de seis reinos proposta por Cavalier-Smith**

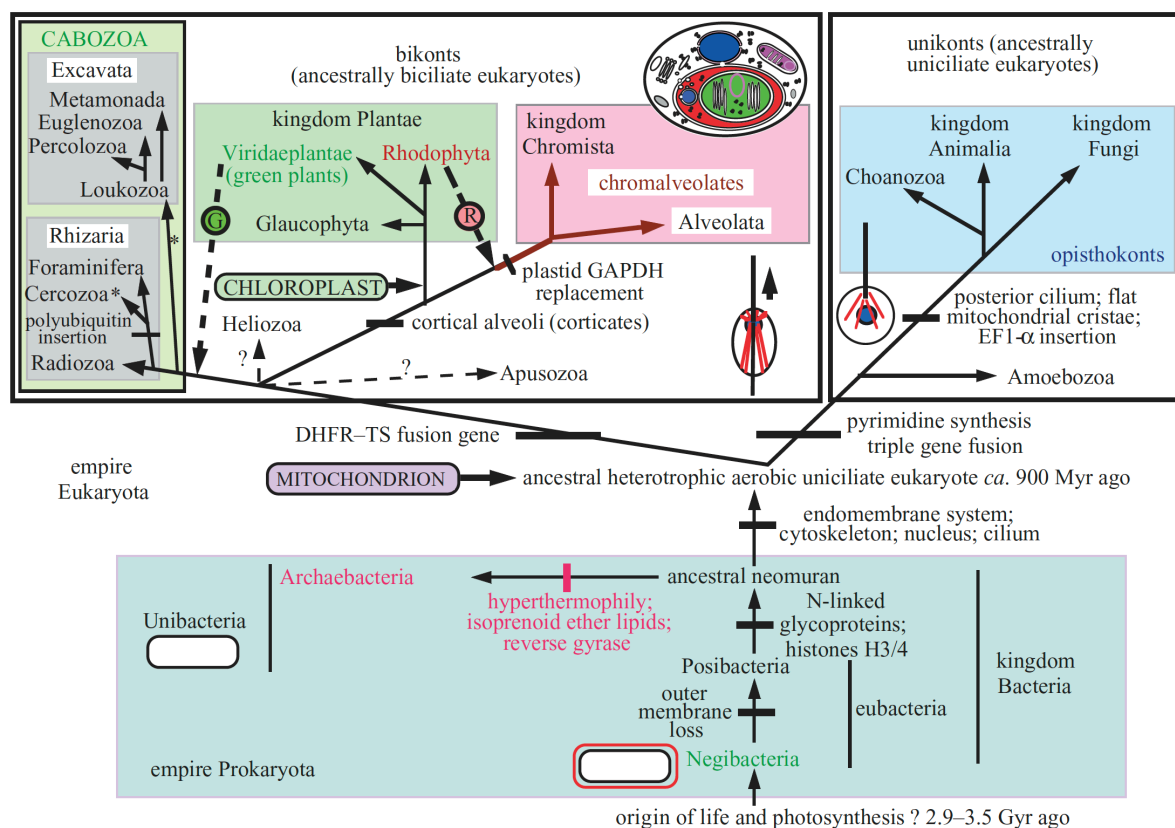
Com os avanços tecnológicos na sequenciação do material genético, Carl Woese, Jan Sapp e outros sistematas moleculares, começaram a pôr em causa a ênfase de Whittaker na trofia como um dos principais critérios na definição dos grandes grupos de organismos. Apesar dos sistemas de classificação de Whittaker reconhecerem aspetos evolutivos, não respeitavam a filogenia.

Assim, nos anos 70, a classificação proposta por Whittaker foi rejeitada, sendo proposta uma classificação cladística em que a filogenia deveria ser um dos critérios mais importantes na definição e agrupamentos de *taxa*. Além disso, a descoberta das *Archaea* levou a que Woese sugerisse que todos os organismos poderiam ser divididos em três domínios: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Porém, Woese mostrou-se bastante crítico em relação à dicotomia procarionte / eucarionte, chegando ao ponto de sugerir a eliminação destes termos do vocabulário biológico. No entanto, esta sugestão foi largamente ignorada (Hagen, 2012).

Outro contribuinte importante na definição dos grandes grupos taxonómicos foi Sir Timothy Cavalier-Smith. Este investigador manteve a distinção entre procariontes e eucariontes, criando uma hierarquia taxonómica designada por Império, separando-os em

Impérios *Prokaryota* e *Eukaryota*. O primeiro incluiria as *Negibacteria* ( $\approx$  bactérias Gram negativas) com duas membranas e um espaço periplásmico (Cavalier-Smith, 2004). Porém, com a perda da membrana exterior, teriam surgido as *Unibacteria*, que englobaria as *Posibacteria* ( $\approx$  Gram positivas) e as “archaeobacteria” (Fig. 1).

Dos procariontes, e com o desenvolvimento do sistema endomembranar, teriam surgidos duas grandes linhagens eucarióticas, nomeadamente os “Unikonts” e os “Bikonts”, que originalmente derivariam de um ancestral comum mono- e biciliado, respetivamente. A separação destas linhagens tinha sido precedida pela captura de uma alfa-proteobactéria por um eucarionte fagotrófico, cerca de 900 milhões de anos atrás, que deu origem às mitocôndrias. Este evento endossimbiótico parece ter sucedido uma única vez durante a



**Fig. 1** – Evolução dos grandes grupos como propostos por Cavalier-Smith (2004). De se notar que o processo evolutivo se inicia com os procariontes. Após a aquisição do sistema endomembranar, citoesqueleto, núcleo e cílios, ter-se-á dado a captura de uma proteobactéria, que deu origem às mitocôndrias. Esta especialização permitiu o aumento do tamanho e complexidade da célula eucariótica. Deste ancestral comum, segundo este autor, desenvolveram-se dois grandes ramos evolutivos, os “Bikonts” (por ex., os reinos *Plantae* e *Chromista*) e os “Unikonts” (por ex., os Reinos *Animalia* e *Fungi*).

evolução, já que todas as mitocôndrias parecem descender de um ancestral comum (**Cavalier-Smith, 2004**), já que os mecanismos de importação de proteínas para este organito pareceriam ser relativamente bem conservados.

O mesmo não parece ser verdade para os cloroplastos, que aparentemente foram originados por eventos endossimbióticos diversos. Cavalier-Smith identificou três eventos principais: 1) evento endossimbiótico primário em que um eucarionte capturou uma cianobactéria que continha clorofila *a* e *b*, bem como ficobilinas, dando origem ao reino *Plantae*, o qual incluiria as algas glaucófitas, rodófitas e clorófitas; 2) endossimbiose secundária em que um eucarionte capturara uma rodófitas, dando origem a um novo reino designado por *Chromista*; e ainda 3) um evento endossimbiótico pela captura de uma clorófitas por um predador eucariótico, dando origem aos “Cabozoa”, uma “clade” que incluiria duas “sub-clades”: *Rhizaria* e *Excavata* (**Fig. 1**).

Apesar do Reino *Plantae* não levantar grandes dúvidas em relação à sua monofilia, embora isso tenha sido posta em causa mais recentemente, o estabelecimento do Reino *Chromista* e da clade *Cabozoa* seria mais contencioso. No que respeita ao Reino *Chromista*, este incluiria as criptófitas, haptófitas (por ex., cocolitóforos e algas como *Isochrysis* spp. e *Pavlova* spp.) e as ocrófitas (por ex., faeófitas, eustigmatófitas e diatomáceas). Foi, então, sugerido igualmente por Cavalier-Smith que os Alveolata (por ex., dinoflagelados) partilhariam um ancestral comum com os organismos anteriores. Esta asserção foi designada pela “hipótese *Chromalveolata*” que propunha que todos os cloroplastos das linhagens *Chromista* e *Alveolata* teriam derivado de um único evento endossimbiótico entre um eucarionte fagotrófico e uma alga vermelha. Tal parecia ser apoiado por várias semelhanças a nível celular e molecular: 1) a ocorrência de clorofila *c* na maior parte dos organismos com cloroplastos; 2) a semelhança da topologia dos cloroplastos em relação ao sistema endomembranar e núcleo, incluindo o fato de possuírem 4 membranas; e 3) a grande proximidade entre haptófitas, criptófitas e ocrófitas ( $\approx$  heterokonts) em análises filogenéticas dos genomas plastidiais respetivos.

### **2.3.3 Problemas com a classificação de 6 reinos e a introdução de “supergrupos”**

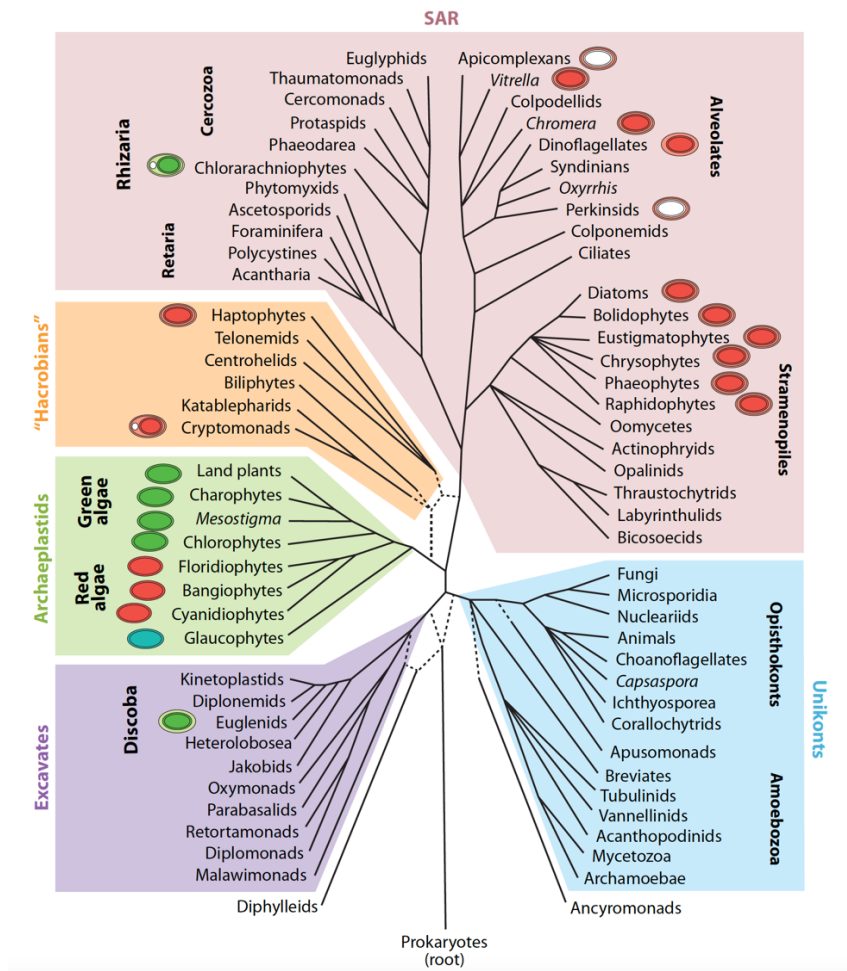
As primeiras indicações que complicaram a confirmação da hipótese *Chromalveolata* derivaram da análise dos genomas plastidiais de alveolados como os *Apicomplexa*, que apresentavam genomas plastidiais muito reduzidos, devido a se terem tornado parasitas

intracelulares (Keeling, 2013). Outro problema correspondia aos genomas plastidiais muito complexos dos dinoflagelados, que se tinham sido pulverizados em pequenos minicírculos, em que a maior parte dos genes teriam migrado para o núcleo da célula hospedeira. Devido a este facto, tornou-se quase impossível de comparar genomas plastidiais entre os *Apicomplexa* e os dinoflagelados. Para resolver esta dificuldade, procurou-se comparar genes que tinham migrado para o núcleo, mas esta comparação deu uma forte indicação que estes genes eram não só parálogos, mas mesmo não homólogos. Estudos de algas simbióticas de corais e com genomas menos reduzidos sugeriram que os cloroplastos dos alveolados teriam uma origem comum e que os cloroplastos dos dinoflagelados teriam derivado da mesma alga vermelha, mas que isso não seria algo universal para todos os “cromalveolados”.

No entanto, o estudo dos genomas dos hospedeiros destes plastos confirmou que os heterokonts (designados por *Stramenopiles* por Keeling), alveolados e as amibas e amiboflagelados pertencentes aos *Rhizaria* pertenciam a uma grande clade designada por SAR (= *Stramenopiles* + *Alveolata* + *Rhizaria*). Porém, esta clade punha em causa a junção dos *Rhizaria* com os *Excavata* na “clade” *Cabozoa*. Além disso, começaram a aparecer as primeiras evidências que as haptófitas e criptófitas não só não deveriam ser consideradas como clades evolutivamente próximas (hipótese “Hacrobia”), mas também que não deveriam pertencer à clade SAR. Igualmente, com o desenvolvimento de matrizes contendo um número crescente de genes e de uma abordagem cada vez mais cladística, começaram a ser sugeridos taxa sem uma designação hierárquica indefinida (Adl *et al.*, 2005, 2012), isto é, os “supergrupos”.

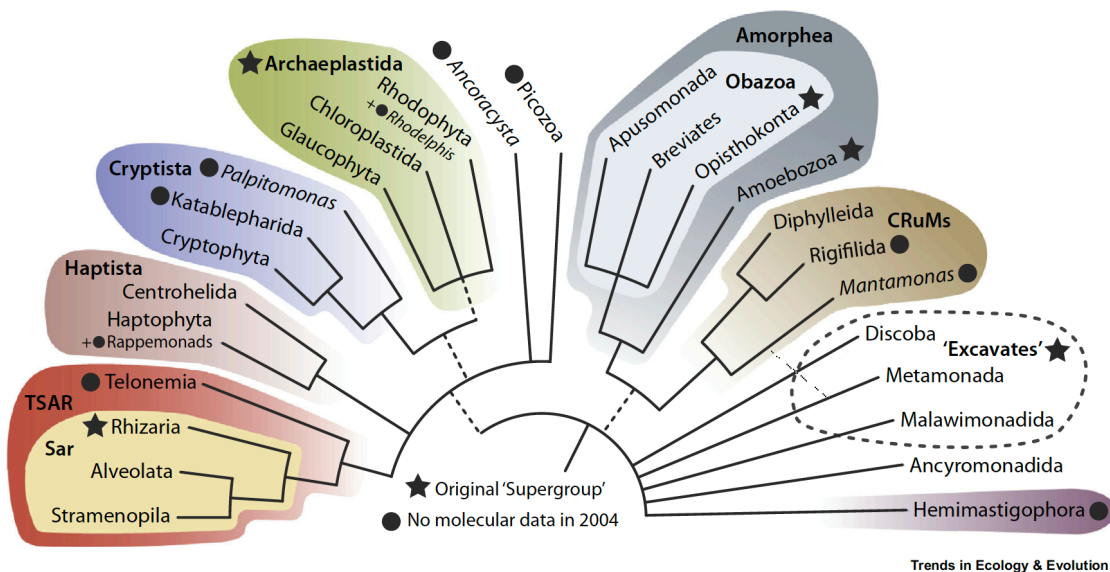
#### 2.3.4 A era dos “Supergrupos”

Atualmente, com estudos de filogenia com conjuntos de genes cada vez maiores, começou a ficar claro que os eucariontes poderiam ser agrupados em seis grandes clades (Fig. 2), nomeadamente o megagrupo SAR, “Hacrobia”, mas já com evidências de que seria um megagrupo polifilético, *Archaeplastida*, e *Excavata*, que corresponderiam aos ditos “bikonts”. Os “unikonts” ficariam agrupados em dois megagrupos, *Opisthokonta* e *Amoebozoa* (Keeling, 2013).



**Fig. 2** – A árvore dos eucariontes como proposta por **Keeling (2013)**. Podem-se distinguir seis megagrupos, nomeadamente os *Excavata* (por ex., *Euglena* e *Leishmania*), *Archaeplastida* (por ex., *Chlorophyta* e *Rhodophyta*), “*Hacrobia*” (por ex., *Haptophyta* e *Cryptophyta*), *SAR* (*Stramenopiles*, *Alveolata* e *Rhizaria*), *Opisthokonta* (por ex., animais e fungos) e amibas pertencentes ao grande grupo das *Amoebozoa*.

Mais recentemente, com os avanços da filogenómica, esta proposta inicial foi refinada e reportada por **Burki et al. (2020)**. Nesta proposta, foi introduzido um novo megagrupo designado por *TSAR*, o qual englobar o antigo megagrupo *SAR* e *Telonema*. Este último táxon corresponde a um grupo de microflagelados que se alimentam de bactérias, com alvéolos corticais com estruturas paracrystalinas (**Fig. 3**). Os “*Hacrobia*” são separados em dois megagrupos designados por *Haptista* e *Cryptista*, que incluem as *Haptophyta* e as *Cryptophyta*, respetivamente. O primeiro parece ser uma clade irmã do megagrupo *TSAR* e a segunda uma clade irmã do megagrupo *Archaeplastida*.



**Fig. 3** – A nova árvore dos eucariontes como proposta por **Burki et al. (2020)**. Os supergrupos TSAR, *Haptista*, *Cryptista*, *Archaeplastida* e *Amorphea* correspondem aos grupos mais biodiversos. Os taxa indicados com uma estrela correspondem aos supergrupos que foram originalmente propostos por F. Burki, P. Keeling, A. Simpson e colegas. Porém, com o isolamento de novos organismos e estudos do seu genoma, chegou-se à conclusão de que alguns antigos supergrupos eram polifiléticos (por ex., “Excavata”, que inclui as microalgas *Euglena* e parasitas como a *Leishmania*) e que haveria novos ramos desta árvore de biodiversidade baixa e praticamente desconhecidos em termos moleculares antes de 2004 (marcados com um círculo preto).

Os *Opisthokonta* e *Amoebozoa*, ou seja, os antigos “unikonts” são agrupados com outros eucariontes para formar um novo megagrupo designado por *Amorphea*, sendo confirmada a polifilia dos “Excavata”. Outros megagrupos são identificados, mas a sua importância é limitada pela sua baixa contribuição para a biodiversidade dos eucariontes.

### 2.3.5 A importância de uma perspectiva evolutiva em biotecnologia

Embora os estudos taxonómicos baseados na morfologia tenham caído, infelizmente, num relativo esquecimento, a filogenia e a filogenómica têm permitido o ressurgir e até revolucionar como entendemos como os eucariontes se relacionam entre si em termos evolutivos. Apesar da biotecnologia ser cada vez mais apelativa, não só para as entidades financiadoras, como para os investigadores e estudantes, esta tem de basear em fundamentos biológicos e bioquímicos para ser eficiente e frutuosa. Existem duas

consequências principais derivadas deste conhecimento: 1) capacidade de prever a resposta de certos microrganismos em termos de gamas do espectro eletromagnético obtidas por LEDs para a indução de compostos de alto valor acrescentado (**Schulze et al., 2017; Schüler et al., 2022**); e 2) um melhor entendimento da bioquímica e biologia molecular de um dado organismo dada a sua filogenia, nomeadamente compreender a razão porque os organismos do megagrupo *Amorphea*, *Archaeplastida* e *Stramenopiles* terem, respetivamente, o glicogénio, amido e  $\beta$ -glucanos (por ex., crisolaminarina) como polissacáridos de reserva (**Ball et al., 2011**). Por outras palavras, a bioquímica e a biologia molecular refletem o historial evolutivo comum de organismos pertencentes a um dado megagrupo e confirmam a congruência dos atuais megagrupos no que respeita ao seu parentesco filogenético e/ou filogenómico.

## 2.4 Recursos e estratégias científico-pedagógicas

Para os alunos terem um ponto de partida para a matéria da lição, os alunos terão acesso à apresentação PowerPoint transformada em PDF numa plataforma Moodle, que será complementada pelo sumário respetivo. Esta lição será complementada por uma discussão em uma aula teórico-prática de alguns artigos citados nesta lição. Artigos seminais serão os de **Whittaker (1969)**, **Cavalier-Smith (2004)**, **Hagen (2012)**, **Keeling (2013)** e **Burki et al. (2020)**.

Além disso, são propostos pontos de discussão, tais como indicados na caixa texto seguinte:

1. Porque Cavalier-Smith propôs que as bactérias Gram-negativas seriam os organismos primordiais que possibilitaram o aparecimento dos eucariontes?
2. Por que razão as mitocôndrias resultaram de um evento único de endossimbiose e os cloroplastos resultaram e ainda resultam de múltiplos eventos endossimbióticos?
3. Qual a atual visão sobre a dicotomia “unikont” e “bikont” tal como indicada por Cavalier-Smith?
4. Qual a importância do estudo da história evolutiva dos organismos eucariontes unicelulares, já que a maioria dos biólogos se dedica principalmente ao estudo de organismos multicelulares?
5. Que aplicações pode ter o estudo destes organismos mais simples, mas que possuem uma complexidade intracelular, por vezes, maior que os organismos multicelulares, com a coexistência não de 2, mas de 4 genomas distribuídos por tantos compartimentos endomembranares?

## 2.5 Referências bibliográficas

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., ... Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryotic Microbiol.* **52**: 399–451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., ... Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryotic Microbiol.* **59**: 429–493. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J. N., & Tirtiaux, C. (2011). The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J. Exp. Botany* **62**: 1775–1801. DOI: 10.1093/jxb/erq411
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. (2020). The new tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **35**: 43-55. DOI: 10.1016/j.tree.2019.08.008
- Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **271**: 1251-1262.
- Hagen, J. B. (2012). Five kingdoms, more or less: Robert Whittaker and the broad classification of organisms. *BioScience* **62**: 67-74. DOI: 10.1525/bio.2012.62.1.11
- Keeling, P. J. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 583-607. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120144
- Schüler, L., Walter, J.M., Kato, H., Suzuki, H., Hulatt, C.J., Rautenberger, R., Navalho, S., Schmid, B., Varela, J., Kiron., V., Schulze, P. (2022). High-value compound induction by flashing light in *Diacronema lutheri* and *Tetraselmis striata* CTP4. *Biores. Technol. Rep.* **19**: 101158. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101158.
- Schulze, P.S.C., Guerra, R., Schüler, L.M., Varela, J.C.S. (2017). Flashing LEDs for microalgal production. *Trends Biotechnol.* **35**: 1088-1101. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.07.011.

Whittaker, R. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**, 150-160. DOI: 10.1126/science.163.3863.150.