

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE GENES DE TOLERANCIA IDENTIFICADOS
EN LA MACROALGA ROJA *Pyropia columbina*
BAJO EL CICLO DESECCACIÓN – RE-HIDRATACIÓN NATURAL:
COMPARACIÓN FUNCIONAL CON ESPECIES SENSIBLES

Memoria de Investigación para optar al título profesional de Bioquímico

CAMILA AMANDA FIERRO QUIROZ

Directora

Dra. Loretto Matilde Contreras Porcia
Laboratorio de Ecología y Biología
Molecular de Algas (LEBMA)
Departamento de Ecología y
Biodiversidad
Facultad de Ecología y Recursos
Naturales
Universidad Andrés Bello

Patrocinante

Dra. Jenny Lucy Fiedler Temer
Laboratorio de Neuroplasticidad y
Neurogenética
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2013

“One of these days, you are going to have to find out where you want to go. And then you've got to start going there.”

The Catcher in the Rye

J.D. Salinger

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi madre Juanita y a mis hermanos Carla y Gabriel. Su apoyo incondicional ha sido fundamental en mi vida. Les agradezco por la fe que siempre me han tenido y por todas las enseñanzas que me entregaron desde niña, que sin duda me han llevado a ser la persona que soy hoy. Sin ustedes nada hubiese sido posible, siempre me recordaron que los esfuerzos y momentos complicados finalmente tienen recompensa. Todo se puede, somos grandes. Los amo.

Muchas gracias a mi directora de tesis, Dra. Loretto Contreras-Porcía por abrirme las puertas de su laboratorio, la confianza depositada en mí, sus consejos y correcciones a lo largo de este camino. Quiero agradecer también a todos los compañeros con los cuales hemos compartido el día a día del Laboratorio de Ecología y Biología Molecular de Algas, gracias por la buena onda, risas, almuerzos compartidos y por siempre estar dispuestos a ayudar. Eduardo y Alejandra: me abrieron un mundo de nuevo conocimiento en cada terreno que compartimos, sin duda el intermareal no es lo mismo sin ustedes. Carlos, gracias por tus consejos, ayuda y la música de los viernes que siempre nos sacó sonrisas. También quiero agradecer al laboratorio del Dr. Juan Correa, por permitir llevar a cabo parte de mis experimentos en sus dependencias.

A mi profesora patrocinante Dra. Jenny Fiedler, le agradezco el interés por ser parte en este proyecto.

Quiero agradecer también a mis queridos compañeros de universidad, con quienes compartimos largas noches de estudio, tertulias y días en que no todo fue fácil, sin duda el paso por “la Chile” no hubiese sido igual sin ustedes. Nacho y Javi, gracias por siempre estar en todas.

En especial quiero agradecer a mis queridos amigos de la vida Leo, Seba y Rocío, quienes incondicionalmente han confiado en mí y han compartido desde el inicio la aventura de convertirse en profesional. Su apoyo y compañía ha sido fundamental para poder atravesar esta etapa.

Maximiliano: te agradezco tu amistad, amor, paciencia, comprensión y compañía en las largas noches y cansados días. Nuestros día a día, conversaciones y aventuras fuera de casa han contribuido enormemente a la finalización de esta memoria. Sin ti, estos años no hubiesen sido ni la mitad de lo buenos que fueron.

Hay mucha gente que ha sido parte en algún momento u otro de este proceso, a todos ellos les agradezco de todo corazón ser parte de mi vida. Soy muy afortunada de estar rodeada de todos ustedes.

Finalmente quiero agradecer al proyecto Fondecyt 1120117 y al proyecto Regular UNABDI-59-12/R, que permitieron financiar esta memoria.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ECUACIONES	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
Macroalgas en Chile.....	1
Estrés por desecación	3
Mecanismos de tolerancia a desecación en plantas	4
Estrés por desecación en macroalgas de Chile.....	6
HIPÓTESIS.....	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos.....	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Instrumentos y Equipos	12
Reactivos.....	12
Recolección de ejemplares y agua de mar.....	13
Experimento de desecación y re-hidratación natural.....	13
Experimento de desecación y re-hidratación <i>in vitro</i>	14
Grado de desecación	14
Extracción de RNA total	15
PCR en tiempo real	16
Extractos proteicos para ensayos enzimáticos.....	19
Actividad trehalosa fosfato sintasa (TPS).....	20
Actividad piruvato deshidrogenasa (PDH).....	21
Actividad peroxirredoxina (PRX).....	22
Actividad tiorredoxina (TRX).....	22
Actividad catalasa (CAT).....	23

III. RESULTADOS.....	24
Grado de desecación	24
Cinética de mRNA de genes de tolerancia en <i>P. columbina</i> bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural.....	25
Eficiencia y especificidad de las reacciones de qPCR	25
Estabilidad y especificidad de <i>sen</i> , utilizado como control endógeno, en los distintos tratamientos experimentales.....	27
Nivel relativo de transcritos de genes asociados al metabolismo basal en <i>P. columbina</i>	28
Nivel relativo de transcritos de genes asociados al metabolismo antioxidante en <i>P. columbina</i>	30
Comparación funcional de los genes de tolerancia a desecación entre <i>Pyropia columbina</i> y las especies sensibles <i>Mazzaella laminarioides</i> , <i>Scytosiphon lomentaria</i> y <i>Lessonia spicata</i>	32
Actividad enzimática trehalosa fosfato sintasa (TPS)	33
Actividad enzimática piruvato deshidrogenasa (PDH)	34
Actividad enzimática peroxirredoxina (PRX)	36
Actividad enzimática tiorredoxina (TRX)	37
Actividad enzimática catalasa (CAT).....	39
IV. DISCUSIÓN.....	42
Transcripción y funcionalidad de los genes en <i>P. columbina</i>	42
Genes asociados al metabolismo basal: trehalosa fosfato sintasa y piruvato deshidrogenasa	42
Genes asociados al metabolismo antioxidante: <i>peroxirredoxina</i> , <i>tiorredoxina</i> y <i>catalasa</i>	45
Análisis funcional de los genes estudiados en las especies sensibles <i>Mazzaella laminarioides</i> , <i>Scytosiphon lomentaria</i> y <i>Lessonia spicata</i>	48
Genes asociados a metabolismo basal.....	48
Genes asociados al metabolismo antioxidante	50
V. CONCLUSIONES.....	53
VI.REFERENCIAS	55
VII. ANEXOS.....	61
Anexo 1. Esquemas de reacciones utilizadas en los ensayos enzimáticos..	61
Anexo 2. Condiciones de ensayo para las reacciones enzimáticas	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	(A) Distribución de especies macroalgales en la zona intermareal rocosa. (B) Macroalgas predominantes en las zonas alta, media-alta, media y baja, de la zona intermareal chilena.	2
Figura 2.	(A) Actividad catalasa en <i>P. columbina</i> durante las horas en que la marea baja (deseccación) y vuelve a subir (re-hidratación). (B) Eficiencia fotosintética en <i>P. columbina</i> durante el ciclo de baja-alta marea.	8
Figura 3.	Categorías funcionales de las secuencias obtenidas de las librerías de <i>P. columbina</i> bajo hidratación y desecación.	9
Figura 4.	Genes identificados en <i>P. columbina</i> : librería de substracción (i.e. hidratación y desecación) y categoría funcional a la cual pertenecen.	10
Figura 5.	Alineamiento de secuencias para el gen <i>proteína asociada a senescencia (sen)</i> , elegido como control endógeno.	18
Figura 6.	Contenido relativo de agua (CRA) en <i>P. columbina</i> bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural.	24
Figura 7.	Curvas de <i>melting</i> para los transcritos de los genes de tolerancia evaluados en <i>P. columbina</i>	26
Figura 8.	Curvas de amplificación para el control endógeno (<i>sen</i>) en las distintas condiciones experimentales.	27
Figura 9.	Niveles relativos de transcritos para <i>trehalosa fosfato sintasa (tps)</i> (A) y <i>piruvato deshidrogenasa (pdh)</i> (B) en <i>P. columbina</i> bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural.	29
Figura 10.	Niveles relativos de transcritos de <i>peroxirredoxina (prx)</i> (A) <i>tiorredoxina (trx)</i> (B) y <i>catalasa (cat)</i> (C) en <i>P. columbina</i> bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural.	31
Figura 11.	Actividad enzimática trehalosa fosfato sintasa (TPS) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación.	34
Figura 12.	Actividad enzimática piruvato deshidrogenasa (PDH) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación.	35
Figura 13.	Actividad enzimática peroxirredoxina (PRX) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación.	37
Figura 14.	Actividad enzimática tiorredoxina (TRX) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación.	38
Figura 15.	Actividad enzimática catalasa (CAT) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación.	41
Figura 16.	Mecanismos de tolerancia bajo desecación en organismos intermareales.	54

Figura 17.	Velocidad de reacción TPS bajo distintas concentraciones de sustrato (A) y tiempo (B).....	63
Figura 18.	Curva estándar para ácido pirúvico.	64
Figura 19.	Velocidad de reacción PDH bajo distintas concentraciones de sustrato (A) y tiempo (B).....	64
Figura 20.	Velocidad de reacción TRX bajo distintas concentraciones de sustrato (A) y tiempo (B).....	65

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Ensayo de actividad trehalosa fosfato sintasa (TPS).....	61
Esquema 2.	Ensayo de actividad piruvato deshidrogenasa (PDH).....	61
Esquema 3.	Ensayo de actividad peroxirredoxina (PRX).	62
Esquema 4.	Ensayo de actividad tiorredoxina (TRX).....	62
Esquema 5.	Ensayo de actividad catalasa (CAT).	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias, longitud y temperaturas de <i>melting</i> (Tm) de los partidores diseñados para cada gen.....	16
Tabla 2.	Genes estudiados en <i>P. columbina</i> : Categoría funcional, eficiencias de amplificación, longitud y temperatura de <i>melting</i> de los fragmentos	25

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.	Contenido relativo de agua (CRA).....	15
Ecuación 2.	Cuantificación relativa de transcritos	18

ABREVIATURAS

(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	:	Sulfato de amonio ferroso
ABA	:	Ácido abscísico
ANOVA	:	Análisis de las varianzas
BCA	:	Ácido bicinconínico
BLAST	:	<i>Basic alignment search tool</i>
BSA	:	Albúmina de suero bovino
CAT	:	Catalasa
cDNA	:	Ácido desoxirribonucleico complementario
CO ₂	:	Dióxido de carbono
CoASH	:	Coenzima A
CRA	:	Contenido relativo de agua
Ct	:	Ciclo umbral de amplificación
DEPC	:	Dietilpirocarbonato
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	:	Desoxirribonucleótido trifosfato
DTT	:	Ditiotreitol
DTNB	:	5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF-5A	:	Factor de iniciación de la traducción 5 A
EROs/ROS	:	Especies reactivas de oxígeno

EST	:	Marcador de secuencia expresada o <i>Expressed sequence tag</i>
FA	:	Formaldehido
FADH ₂	:	Dinucleótido de flavina-adenina
HNE	:	4-hidroxi-2-nonenal
HSP	:	Proteínas asociadas al choque térmico o <i>Heat shock proteins</i>
LEA	:	Proteínas del tipo abundante en la embriogénesis tardía o <i>Late embryogenesis abundant</i>
MnSOD	:	Superóxido dismutasa de manganeso
MOPS	:	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NAD ⁺	:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADP-ME	:	Enzima málica NADP
NCBI	:	<i>National center of biotechnology Information</i>
O ₂ ⁻	:	Radical superóxido
OAA	:	Ácido oxalacético
PEP	:	Fosfoenolpiruvato
PDH	:	Piruvato deshidrogenasa
PRX	:	Peroxirredoxina
PVP-40	:	Polivinilpirrolidona
qRT-PCR	:	Transcripción inversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	:	Ácido Ribonucleico
RUBISCO	:	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
SCN-	:	Anión tiocianato

SEN	:	Proteína asociada a senescencia
TCA	:	Ácido tricloro acético
Tm	:	Temperatura de <i>melting</i>
TNB	:	2-nitro-5-tiobenzoato
TPP	:	Tiamina pirofosfato
TPS	:	Trehalosa 6-fosfato sintasa
TRX	:	Tiorredoxina

RESUMEN

Cinética de expresión de genes de tolerancia identificados en la macroalga roja *Pyropia columbina* bajo el ciclo desecación – re-hidratación natural: comparación funcional con especies sensibles

La distribución diferencial de las especies macroalgales que habitan la zona intermareal está influenciada por diversos factores entre los que destaca la desecación. Este factor, que se encuentra asociado a oscilaciones de los niveles de la marea y a condiciones climáticas, puede generar alteraciones fisiológicas, estrés oxidativo e incluso la muerte celular en organismos intermareales sensibles a estrés mediante vías dependientes de especies reactivas de oxígeno (EROs). La macroalga *Pyropia columbina* habita exitosamente la zona alta del intermareal chileno, por lo cual es considerada un modelo tolerante a desecación. Bajo esta condición de estrés, se ha observado la activación de enzimas antioxidantes y cambios a nivel proteómico y metabolómico. Sin embargo, poco se conoce sobre la tolerancia a desecación a nivel molecular. Con el fin de comprender la modulación génica de esta especie bajo desecación, se analizó mediante qRT-PCR y actividad enzimática la cinética de expresión de genes de tolerancia presentes en *P. columbina*, bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural. Además, las respuestas de los productos génicos codificados por estos factores de tolerancia se compararon mediante análisis enzimático en las especies sensibles que habitan la zona

media y baja del intermareal (i.e. *Mazzaella laminarioides*, *Scytosiphon lomentaria* y *Lessonia spicata*). Los resultados indican que diariamente durante desecación, el nivel relativo de transcritos de genes asociados al metabolismo basal en *P. columbina* disminuye significativamente. Sin embargo, durante rehidratación el nivel de sus mRNA aumenta alrededor de 4 veces. Contrariamente, genes asociados al metabolismo antioxidante aumentan sus transcritos 15-20 veces durante desecación, retornando a niveles basales hacia el final del período de re-hidratación. Comparativamente, todas las enzimas antioxidantes tuvieron una mayor actividad en *P. columbina* durante desecación. Las especies que habitan la zona más baja del intermareal (*S. lomentaria* y *L. spicata*) mostraron los menores niveles de actividad e incluso inhibición enzimática. Los resultados demuestran que durante el proceso de desecación, existe una expresión génica diferencial de los factores de tolerancia en *P. columbina* y que las especies sensibles presentan una respuesta ineficiente a ésta condición de estrés. Estos resultados aportan significativamente al conocimiento de las bases funcionales y moleculares que sustentan los patrones ecológicos de distribución diferencial en la zona intermareal rocosa.

ABSTRACT

Differential gene expression of *Pyropia columbina* tolerance genes under the natural desiccation-rehydration cycle: functional comparison with sensitive intertidal species.

The differential distribution of macroalgae species on the intertidal rocky zone is influenced by several factors such as desiccation. This stress factor, associated with daily tidal changes and climate conditions, can generate oxidative stress, physiological alterations and cellular death on sensible intertidal organisms by means of oxygen reactive species (ROS). The seaweed *Pyropia columbina* is considered a model of desiccation tolerance because of its ability to inhabit the upper zone of the intertidal rocky zone. Under this stress condition, activation of antioxidant enzymes and proteomic and metabolic alterations has been observed. However, the behavior at genetic level remains unknown. In order to understand the genetic modulation of this species under desiccation, the kinetics of gene expression of several tolerance factors in *P. columbina* was analyzed by qRT-PCR and enzymatic assays under the natural desiccation-rehydration cycle. In addition, the responses of these gene products were compared by enzymatic analysis in the sensitive species that inhabit the middle and lower part of the intertidal zone (i.e. *Mazzaella laminarioides*, *Scytosiphon lomentaria* and *Lessonia spicata*). The results indicate that during desiccation

the relative mRNA levels of genes associated with basal metabolism in *P. columbina* was down-regulated. However, during rehydration their levels were increased fourfold. On the other hand, transcript levels of genes associated with the antioxidant metabolism increased about 15-20 times during the stress period, returning to basal levels during the final hours of rehydration. All antioxidant enzymes studied showed higher specific activity on *P. columbina* under desiccation. Species that inhabit the lower parts of the intertidal zone (*S. lomentaria* and *L. spicata*) exhibited lower levels and even enzymatic inactivation. These results show that under desiccation *Pyropia columbina* presents a differential gene expression of tolerance factors and that sensitive species have an inefficient response to this stress condition. The results obtained in this work, significantly contribute to the understanding of the differential distribution patterns of seaweeds on the intertidal rocky zone at a molecular and functional level.

I. INTRODUCCIÓN

Macroalgas en Chile

Las macroalgas son organismos que forman parte de los ecosistemas costeros y poseen una gran importancia ecológica, promoviendo el desarrollo y supervivencia de variados organismos (Harley y cols. 2006). El ecosistema intermareal de Chile, el cual comprende la zona entre las líneas imaginarias de alta y baja marea, está constituido por medio centenar de géneros de macroalgas (Hoffmann y Santelices 1997). Estos organismos interactúan en un ecosistema dinámico sensible a los cambios producidos por las mareas naturales y vulnerable a la intervención humana y a los cambios climáticos (Tomanek y Helmuth 2002; Harley y cols. 2006).

La ubicación de las macroalgas en la zona intermareal está determinada por factores físicos (p.ej. temperatura, humedad) y biológicos (p.ej. competencia, depredación), los cuales influyen diferencialmente a lo largo de la zona. Por ejemplo, se ha evidenciado que los factores físicos tienen mayor importancia en la zona alta del intermareal, donde las especies pasan gran parte del día descubiertas de agua. Mientras que los factores biológicos son más influyentes en la zona baja, donde la diversidad de organismos es mayor (Helmuth 2002; Tomanek y Helmuth 2002; Harley y cols. 2006) (Figura 1 A).

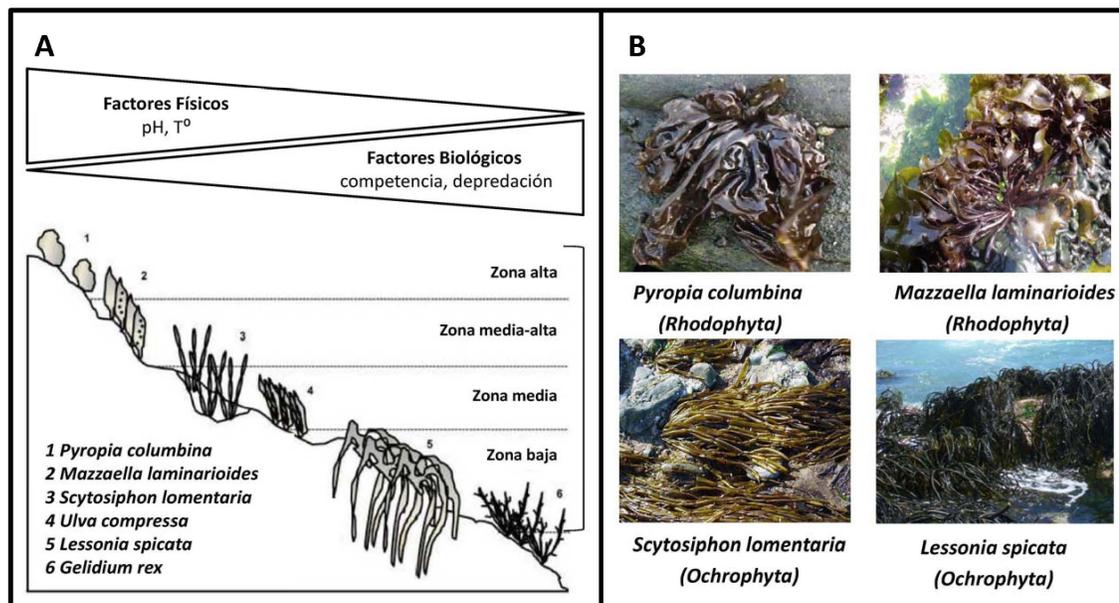


Figura 1. (A) Distribución de especies macroalgales en la zona intermareal rocosa, la cual se encuentra asociada a factores físicos y biológicos. Modificado de Flores y cols. (datos no publicados). (B) Macroalgas predominantes en las zonas alta, media-alta, media y baja, de la zona intermareal chilena.

El intermareal se encuentra dividido en cuatro zonas: alta, media-alta, media y baja, cada una habitada predominantemente por una o varias especies macroalgales (Figura 1 B). En la zona más alta habita *Pyropia columbina* (Montagne) Nelson (Bangiales, Rhodophyta) (previamente descrita como *Porphyra columbina* (Sutherland y cols. 2011)). Esta especie, comúnmente conocida como “luche”, es una macroalga roja perteneciente al linaje más antiguo de los eucariontes fotosintéticos que habita en casi toda la costa chilena, desde el paralelo 20 °S al 54 °S (Hoffmann y Santelices 1997). Más abajo, en la zona media-alta, habita la macroalga roja *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta), la cual se distribuye desde los paralelos 28 °S al 56

°S (Montecinos y cols. 2012). Con respecto a la zona media, se encuentran en alta abundancia las especies *Ulva compressa* (Ulvales, Chlorophyta), una macroalga verde y *Scytosiphon lomentaria* (Ectocarpales, Ochrophyta), una macroalga parda, la cual se ubica desde la zona de Antofagasta a Magallanes (23 °S – 70 °S) (Camus y cols. 2005). Finalmente, en el extremo inferior de la zona intermareal, que colinda con el espacio submareal, co-existen una gran cantidad de organismos de variadas especies, destacando entre ellas *Lessonia spicata* (Suhr) Santelices (Laminariales, Ochrophyta), la cual se distribuye en la zona centro-sur del país (29 °S – 41 °S) (González y cols. 2012).

Estrés por desecación

Entre los factores físicos que determinan la ubicación de las especies macroalgales destaca la desecación. Ésta es inducida en los organismos por los bajos niveles de marea y alteraciones climáticas (Burrit y cols. 2002; Moore y cols. 2009). Las macroalgas se encuentran expuestas diariamente a esta condición de estrés debido al ciclo natural de mareas, y a causa de esto, pueden perder más del 90 % del contenido de agua intracelular (Moore y cols. 2009). Pero no son los únicos tipos de organismos que día a día se enfrentan a este tipo de estrés. Por ejemplo, existe un grupo de plantas vasculares llamadas plantas de resurrección, las cuales habitan zonas desérticas o semi-desérticas y que deben lidiar durante largos periodos con la desecación y sus efectos. En este grupo de plantas, las hojas se deshidratan casi totalmente

cuando la humedad ambiental disminuye y posteriormente, cuando la humedad retorna hacia valores normales, las hojas se vuelven a hidratar permitiendo la recuperación de la totalidad de las funciones vitales (Vicré y cols. 2004; Dinakar y Bartels 2012).

En plantas de resurrección se ha evidenciado que durante desecación, se produce estrés mecánico sobre las membranas y paredes celulares (Moore y cols. 2009; Leprince y Buitink 2010), se forman agregados de macromoléculas y se desintegran algunos organelos (Farrant 2000; França y cols. 2007; Leprince y Buitink 2010). Además, se produce el cierre de los estomas, con la consiguiente baja del dióxido de carbono (CO₂) intracelular (Zou y Gao 2002), inhibiéndose la asimilación de carbono y la capacidad fotosintética (Bohnert 2000; Bartels y Salamini 2001; Foyer y Noctor 2009). Por otro lado, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), pudiéndose producir la muerte celular mediada por estas moléculas (Zou y Gao 2002; França y cols. 2007; Moore y cols. 2009).

Mecanismos de tolerancia a desecación en plantas

Las plantas de resurrección han desarrollado una serie de mecanismos para proteger en primera instancia la integridad celular bajo desecación (Farrant 2000; Moore y cols. 2009). Se ha propuesto que proteínas del tipo abundante en la embriogénesis tardía o *Late embryogenesis abundant* (LEA) y del tipo de choque térmico o *Heat shock proteins* (HSP) se asociarían con estructuras

intracelulares, membranas y macromoléculas promoviendo su estabilización (Alpert 2006; França y cols. 2007; Leprince y Buitink 2010; Dinakar y Bartels 2012). Por otro lado, se ha descrito la activación de vías dependientes de ácido abscísico (ABA) (Alpert 2000; Yokoya y cols. 2010; Stolf-Moreira y cols. 2011), una hormona vegetal que actúa como molécula señal que activa mecanismos mediante cambios en el metabolismo de carbohidratos (Müller y cols. 1997; Kleines y cols. 1999; Moore y cols. 2009) y en la síntesis y degradación de proteínas relacionadas con la fotosíntesis (Moore y cols. 2009). Sin embargo, se ha observado que algunos genes de tolerancia a la desecación no son regulados por ABA, por lo cual más de una vía de señalización se encontraría involucrada en las respuestas a este tipo de estrés (Toldi y cols. 2009). El cambio observado en el metabolismo de carbohidratos comprende la degradación de moléculas de reserva energética (Müller y cols. 1997; Moore y cols. 2009) y la síntesis de azúcares solubles como trehalosa y sacarosa, que estabilizan y protegen las membranas celulares (Kleines y cols. 1999; França y cols. 2007; Grennan 2007; Toldi y cols. 2009). Con respecto a las proteínas asociadas a la fotosíntesis, se ha observado un aumento en la producción de ciertos pigmentos accesorios, que minimizan el daño foto-oxidativo producido al captar luz, impidiendo la fotosíntesis y disminuyendo las EROs generadas por las reacciones asociadas a ésta (Farrant 2000; Leprince y Buitink 2010; Dinakar y Bartels 2012).

La sobre-producción intracelular de EROs, proveniente de reacciones metabólicas (p.ej. fotosíntesis, respiración celular) genera proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos oxidados (Baker y Orlandi 1995; França y cols. 2007; Contreras y cols. 2009, Contreras-Porcía y cols. 2011), lo cual desencadena una condición de estrés oxidativo que puede terminar con la muerte celular. Como respuesta a este fenómeno, se ha registrado un aumento de proteínas antioxidantes (p.ej. glutatión reductasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y tioredoxina) (França y cols. 2007; Leprince y Buitink 2010; Stolf-Moreira y cols. 2011). Todo lo anterior mantiene la integridad celular y promueve la sobrevivencia del organismo bajo desecación.

Estrés por desecación en macroalgas de Chile

En algas, a diferencia de plantas y animales, no existen suficientes estudios sobre mecanismos de tolerancia a factores ambientales incluyendo la desecación (Toldi y cols. 2009). De forma natural, las especies macroalgales de la zona intermareal se encuentran expuestas a este estrés, producido por el ciclo natural diario de las mareas y cambios climáticos (Burrit y cols. 2002; Sampath-Wiley y cols. 2008; Contreras-Porcía y cols. 2011). En este contexto, diversas rutas de tolerancia deben estar presentes en estas especies para responder eficientemente a esta condición ambiental.

En Chile, el alga *Pyropia columbina* se distribuye en la zona más alta del intermareal rocoso y presenta eficientes mecanismos de tolerancia al estrés por

deseccación, condición por la cual pierde hasta un 96 % del contenido intracelular de agua (Contreras-Porcía y cols. 2011). Contrariamente, especies que habitan la zona intermareal por debajo de *P. columbina* (i. e. *Mazzaella laminarioides*, *Scytosiphon lomentaria* y *Lessonia spicata*), no son capaces de tolerar un alto grado de desecación, tanto en estados de desarrollo micro y macroscópicos (Contreras-Porcía y cols. 2012; Flores-Molina y cols. datos no publicados; López-Cristoffanini y cols. datos no publicados).

Los mecanismos de tolerancia descritos en *P. columbina* han sido evidenciados mediante análisis enzimáticos y recientemente, mediante proteómica y muestran similitud con aquellos registrados en plantas de resurrección (Contreras-Porcía y cols. 2011, 2012; López 2012). Durante las horas en que baja la marea y se produce desecación, en *P. columbina* aumenta la actividad de ciertas enzimas antioxidantes como catalasa, ascorbato peroxidasa, peroxirredoxina y lipoxigenasa (Contreras-Porcía y cols. 2011, 2012). Sin embargo, esta actividad disminuye rápidamente cuando la marea vuelve a aumentar y los organismos se re-hidratán (Figura 2 A). Por otro lado, se ha observado un fenómeno conocido como inactivación fotosintética, en el cual la actividad del fotosistema II se inhibe a niveles basales durante desecación. Sin embargo, durante re-hidratación se produce una recuperación absoluta de la capacidad fotosintética (Figura 2 B) (Contreras-Porcía y cols. 2011).

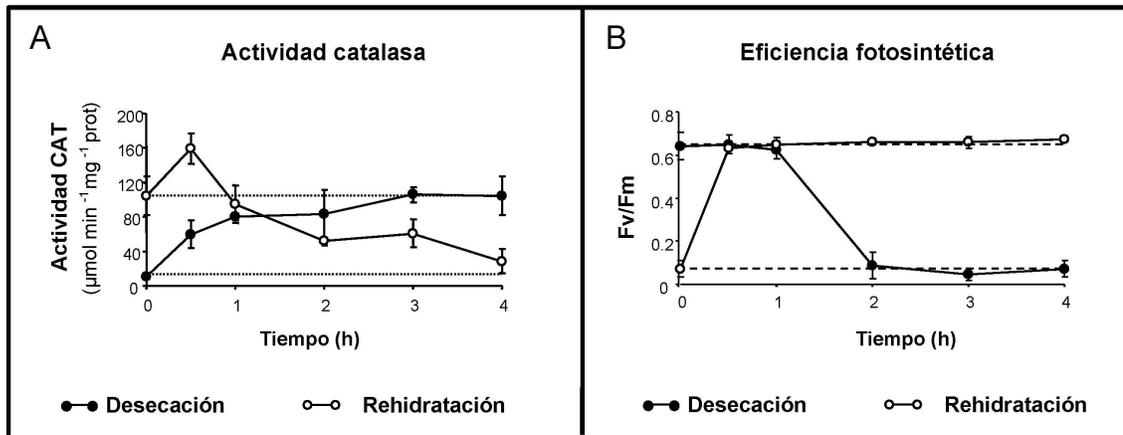


Figura 2. (A) Actividad catalasa en *P. columbina* durante las horas en que la marea baja (deseccación) y vuelve a subir (re-hidratación). (B) Eficiencia fotosintética en *P. columbina* durante el ciclo de baja-alta marea. El índice F_v/F_m indica la capacidad fotosintética del organismo. Círculos rellenos corresponden a horas de desecación y círculos vacíos a horas de re-hidratación. Fuente: Contreras-Porcía et al. 2011

Con respecto a los análisis proteicos de *P. columbina* durante desecación, se ha observado una variación importante en el proteoma algal. Ocurre una inducción *de novo* de un gran número de proteínas, acompañada de una sub-expresión de otras (López 2012). Recientemente Contreras y cols. (2013) obtuvieron un perfil transcriptómico de *P. columbina* bajo condiciones de hidratación y desecación natural mediante dos librerías de substracción de cDNA, las cuales fueron secuenciadas, identificadas y clasificadas en trece categorías funcionales (Contreras-Porcía y cols. 2013) (Figura 3). Este estudio reveló que entre hidratación y desecación natural existen diferencias en los niveles de transcritos de genes pertenecientes a diversas rutas metabólicas. En este contexto, esta especie toleraría el estrés por desecación mediante la activación e inactivación de ciertos genes que le permiten sobrellevar los

efectos nocivos que produce esta condición ambiental. De este estudio llamaron particularmente la atención dos categorías que se relacionan además con los antecedentes bibliográficos descritos. Estas son a: i) Metabolismo basal, la cual incluye genes como *trehalosa fosfato sintasa* y *piruvato deshidrogenasa*, que están involucrados en la síntesis y degradación de ciertos azúcares a nivel celular y ii) Metabolismo antioxidante, la cual incluye genes como *peroxirredoxina*, *tiorredoxina* y *catalasa*, los que se relacionan con el control intracelular de EROs (Figura 4).

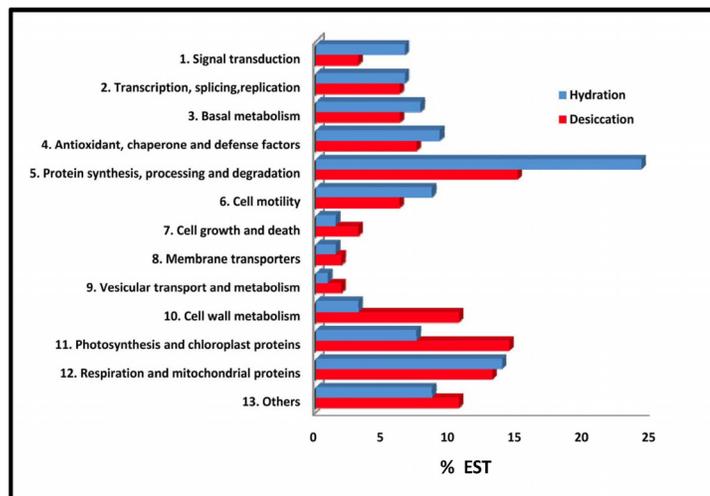


Figura 3. Categorías funcionales de las secuencias obtenidas de las librerías de *P. columbina* bajo hidratación y desecación. En azul se observan las secuencias correspondientes a la librería bajo hidratación y en rojo las provenientes de la librería bajo desecación. El porcentaje indica el número de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) obtenido en cada categoría funcional en relación al total de cada librería. (Tomado de Contreras-Porcía y cols. 2013).

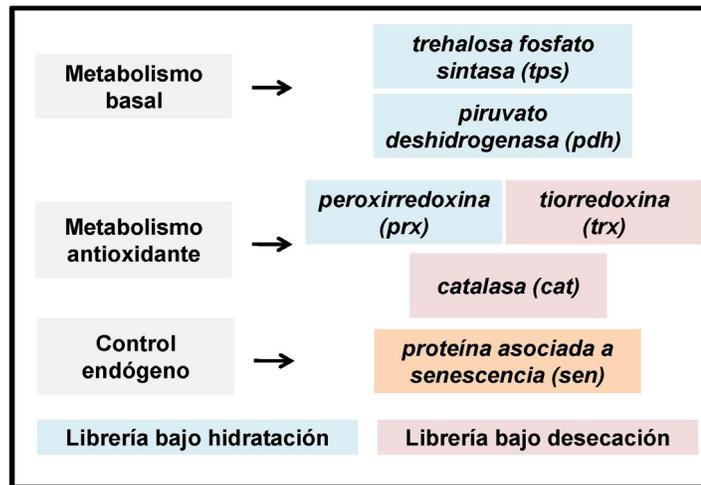


Figura 4. Genes identificados en *P. columbina*: librería de substracción (i.e. hidratación y desecación) y categoría funcional a la cual pertenecen.

En este estudio, se evaluará mediante qRT-PCR la cinética de mRNA de genes de tolerancia asociados a las rutas de metabolismo basal y antioxidante. Por otra parte, como análisis funcional, se compararán las respuestas de los productos génicos codificados por estos genes, en especies de algas sensibles a esta condición de estrés (i.e. *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata*). En este contexto, este trabajo permitirá: i) describir la cinética de mRNA a nivel temporal de las vías de tolerancia en *P. columbina* bajo los estados de desecación y re-hidratación natural y ii) evidenciar diferencias funcionales de los mecanismos de tolerancia en otras especies de macroalgas, con el fin de entender el patrón ecológico que éstas presentan a nivel de distribución local en el intermareal rocoso.

HIPÓTESIS

H1: *Pyropia columbina* expresa diferencialmente un conjunto de genes involucrados en los mecanismos de tolerancia al estrés por desecación, condición generada durante el ciclo natural de mareas.

H2: Las especies que habitan la zona intermareal por debajo de *P. columbina* son sensibles a desecación debido a que tienen menor actividad enzimática de las proteínas descritas en la especie tolerante.

Objetivo general

Determinar la expresión diferencial de genes de tolerancia en *P. columbina* bajo desecación y re-hidratación natural, y comparar la funcionalidad de éstos en especies sensibles.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de mRNA de genes pertenecientes a la categoría metabolismo basal y antioxidante, relacionadas con la tolerancia a desecación en *P. columbina*, bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural.
2. Comparar la actividad enzimática de los productos génicos que forman parte de los mecanismos de tolerancia descritos en *P. columbina*, en las especies sensibles *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata*, bajo desecación *in vitro*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentos y Equipos

Los instrumentos y equipos utilizados fueron: gabinete de bioseguridad JS Research JSCB-1200S; cámara de cultivo AMILAB, purificador de agua Thermo Scientific Barnstead Easypure II RF, baño termostático Labtech LWB-122D, sistema de PCR en tiempo real StepOne de Applied Biosystems, espectrofotómetros Thermo Scientific NanoDrop 1000 y BioRad UV/Visible Smartspect 3000, microcentrifuga Eppendorf Minispin, centrifuga refrigerada Hettich Universal 320R, cámara de electroforesis Biorad Mini-Subcell GT y fuente de Poder Biorad PowerPac HV.

Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, EEUU): set dNTPs 100mM, DNasa I Grado Amp Grade, Oligo dT₁₂₋₁₈ y enzima Superscript II. Fast SYBR Green master mix fue adquirido en Life Technologies (Carlsbad, EEUU), la tinción de ácidos nucleicos GelRed, se adquirió en Gen Xpress y el kit de extracción RNeasy plant mini se obtuvo de Qiagen (Hilden, Alemania). El kit Pierce BCA Protein Assay se adquirió de Thermo Scientific (Waltham, EEUU). En Sigma (St. Louis, EEUU) se adquirieron Coenzima A (CoASH), Tiamina pirofosfato (TPP), Ácido oxalacético (OAA), 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), Fosfoenolpiruvato (PEP) y las enzima Citrato sintasa (C3260) y Piruvato kinasa (P9136). La insulina Humulin® se obtuvo de

Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN, EEUU). En Merck (Darmstadt, Alemania) se adquirieron Glucosa 6 fosfato y UDP-Glucosa.

Recolección de ejemplares y agua de mar

La recolección se realizó en la localidad de Maitencillo, Valparaíso (32° 39,5' S, 71° 26,6' W; V Región, Chile). Los ejemplares se recolectaron desde plataformas rocosas a lo largo de 200 metros de costa y de manera azarosa. El agua de mar utilizada para los lavados y experimentos se obtuvo en Quintay, la cual fue previamente filtrada a través de filtros de membrana MF (Milipore) de 0,22 μm y mantenida en oscuridad a 12 °C hasta su utilización.

Experimento de desecación y re-hidratación natural

Durante el periodo de alta marea, se recolectaron ejemplares naturalmente hidratados de *P. columbina*, los que fueron lavados en agua de mar previamente filtrada y luego en agua ultrapura (miliQ) para eliminar sales, epífitos y materia orgánica. Estos ejemplares fueron de inmediato rotulados y congelados en nitrógeno líquido. Luego, mientras la marea bajaba y las algas quedaban al descubierto, se recolectaron ejemplares desecados naturalmente en los tiempos 1, 2 y 4 h. Finalmente, mientras la marea retornaba a niveles altos, volviendo a sumergir las algas, se recolectaron especímenes re-hidratados durante 2 y 4 h. Todos estos ejemplares fueron lavados y congelados según lo descrito previamente.

Experimento de desecación y re-hidratación *in vitro*

Se recolectaron ejemplares naturalmente hidratados de las especies *P. columbina* y *M. laminarioides* durante el periodo de marea alta, y de *S. lomentaria* y *L. spicata* durante baja marea, ya que durante este periodo éstas se encuentran accesibles. Luego, los ejemplares fueron almacenados en agua de mar a 12 °C y llevados al laboratorio. Posteriormente, las algas se lavaron de la manera descrita en el experimento natural y varias réplicas de 3 a 5 individuos fueron congeladas a -32 °C (grupo control de hidratación). El resto de las plantas hidratadas fueron sometidas a desecación *in vitro* en una cámara de crecimiento a 15 °C, con 800-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de radiación de fotones durante 1, 2 y 4 h, periodo que simula la baja marea natural. Posterior a cada tiempo de desecación, varias réplicas fueron congeladas inmediatamente a -32 °C (grupos experimentales de desecación). Luego de las cuatro horas de desecación, las algas restantes fueron re-hidratadas con agua de mar filtrada durante 2 y 4 h en la misma cámara de crecimiento. Finalizado cada tiempo de re-hidratación, los ejemplares fueron congelados y almacenados (grupos experimentales de re-hidratación).

Grado de desecación

Para determinar el grado de desecación, descrito como contenido de relativo de agua (CRA) (Ecuación 1), las muestras *in vitro* se pesaron al inicio del experimento (P_i), al final del periodo de desecación (P_d) y cuando el tejido estuvo totalmente seco a 40 °C (P_{do}).

Ecuación 1. Contenido relativo de agua (CRA)

$$CRA (\%) = \frac{(P_i - P_d)}{(P_i - P_{do})}$$

Extracción de RNA total

Previamente a la extracción, todo el material de trabajo fue tratado en dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1 % en agua miliQ durante 24 h, y posteriormente autoclavado. Para la extracción de RNA, 1 g de tejido se congeló y pulverizó con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. Luego se homogeneizó en 5-8 mL de amortiguador de lisis (Tiocianato de guanidino 4 M, EDTA 25 mM, Acetato de sodio 200 mM, Polivinilpirrolidona 2 %, 2-Mercaptoetanol 1 %). El homogeneizado, en presencia de sarcosina 2 %, se incubó a 70 °C durante 10 min con agitación constante y luego fue centrifugado 2 min a 12000 x g. El RNA presente en el sobrenadante, se extrajo utilizando el kit RNeasy plant mini kit (Qiagen, Alemania) según especificaciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA extraído se evaluó mediante espectrofotometría en NanoDrop. La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza evaluando la razón de absorbancias a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}), donde razones $\geq 2,0$ indican RNA puro. Por otro lado, la integridad del RNA fue evaluada en un gel de agarosa 1,2 %, el cual fue preparado en amortiguador FA 1X (MOPS 20 mM, Acetato de sodio 5 mM y EDTA 1 mM) con adición de formaldehído 0,2 M. Luego se aplicó voltaje constante en razón de 7 V/cm durante 75 min. Finalmente, los RNA que cumplieran con criterios de pureza e integridad fueron utilizados en los análisis posteriores.

PCR en tiempo real

Se diseñaron partidores específicos a partir de las secuencias de cDNA obtenidas de las librerías de substracción de *P. columbina* para los genes: *proteína asociada a senescencia (sen)*, como gen de control endógeno; *trehalosa fosfato sintasa (tps)*, *piruvato deshidrogenasa (pdh)*, *peroxirredoxina (prx)*, *tiorredoxina (trx)* y *catalasa (cat)*. El diseño de los partidores se realizó con los programas de código libre Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) y Oligoanalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/olyzer/applications/oligoanalyzer/>), eligiéndose para experimentación las parejas que cumplieran características compatibles con PCR en tiempo real (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias, longitud y temperaturas de *melting* (T_m) de los partidores diseñados para cada gen. Se muestra además la longitud del fragmento a amplificar.

Gen	Abreviación	Secuencia de partidores	T _m (°C)	Longitud partidor (pb)	Longitud amplicón (pb)
<i>control endógeno</i>	<i>sen</i>	F TCGCAATGATAGGAAGAGC	57	19	114
		R TTTACCAGAGGTGTCCGA	59	18	
<i>trehalosa fosfato sintasa</i>	<i>tps</i>	F GGGCAGGTACATCATCCCAA	63	20	146
		R TCATATCGGCTACCATCTGTGT	60	22	
<i>piruvato deshidrogenasa</i>	<i>pdh</i>	F CCATTCGTGATCCTGACCCA	64	20	164
		R CGGGAATGAGCAACGAGTGT	64	20	
<i>peroxirredoxina</i>	<i>prx</i>	F CTGCCATGCTATGTGACTTTG	60	21	148
		R CGGCTGCATAATTCGTGAA	61	19	
<i>tiorredoxina</i>	<i>trx</i>	F CGAATAGGGCAGAGTGTATGA	58	21	156
		R ACTGTCGCTGATGTGGTTTG	60	20	
<i>catalasa</i>	<i>cat</i>	F CGCAGGGATGCCGTAATCAG	64	20	154
		R CCAGCGACACTTTGTTGACG	63	20	

Además, las secuencias obtenidas se compararon con aquellas publicadas en las bases de datos de GenBank mediante la herramienta de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para asegurar la especificidad de los partidores hacia los genes de interés. La síntesis de cDNA y la amplificación por PCR en tiempo real se realizó en dos pasos. En una primera etapa, el RNA se trató con DNAsa I Amplification Grade (Invitrogen) para eliminar residuos de DNA que pudiesen estar presentes. Luego, se incubó con Oligo dT₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) y se agregó la enzima transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), todo según protocolo de fabricante. En la segunda etapa, se realizó la amplificación utilizando el kit Fast SYBR Green master mix (Applied Biosystems). Las reacciones de esta etapa se realizaron en un volumen final de 10 μ L que incluyó el medio de reacción, los partidores específicos directo e inverso, el cDNA blanco y el agua ultrapura grado PCR (Gibco, Life Technologies). Se utilizó el programa de amplificación indicado por el fabricante del kit, con una temperatura de alineamiento de 60 °C.

El análisis de nivel relativo se realizó mediante el método descrito por Michael W. Pfaffl (Pfaffl 2001) utilizando la Ecuación 2. Este método calcula los niveles relativos de transcritos de un gen (N. relativo), determinando la razón entre las eficiencias de amplificación para el transcrito del gen de interés y del control endógeno, cada una elevada a la diferencia entre los ciclos umbrales (Ct) del tratamiento y la condición control (Δ Ct).

Ecuación 2. Cuantificación relativa de transcritos

$$N. \text{ relativa} = \frac{(Eficiencia_{transcrito \text{ de interés}})^{\Delta Ct_{de \text{ interés}}}}{(Eficiencia_{transcrito \text{ control endógeno}})^{\Delta Ct_{control \text{ endógeno}}}}$$

Como control endógeno se utilizó la secuencia génica de una proteína asociada a senescencia (*sen*). Esta elección se basó en que i) los transcritos de genes utilizados regularmente como control endógeno (i.e. *beta actina*, *sub-unidad 18S ribosomal* y *gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa*) (Le Bail y cols. 2008; de Boer y cols. 2009; Guo y Ki 2012), se encontraron inducidos en alguna de las librerías analizadas y ii) debido al alto grado de similitud de secuencia en relación a otras seis especies pertenecientes a distintas Phyla (Figura 5).

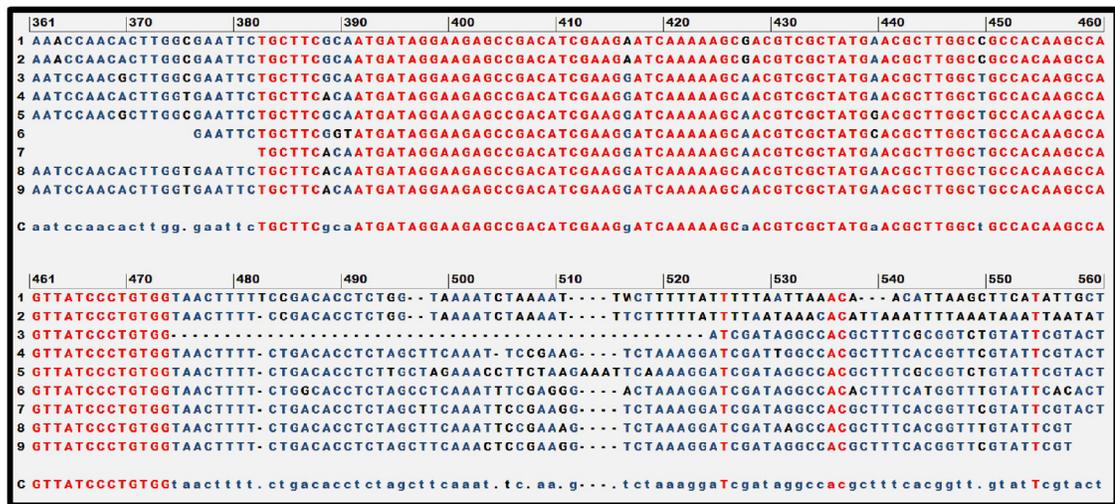


Figura 5. Alineamiento de secuencias para el gen *proteína asociada a senescencia (sen)*, elegido como control endógeno. Los números corresponden a los distintos organismos analizados: 1.- *P. columbina* librería hidratación, 2.- *P. columbina* librería desecación, 3.- *Brugia malayi*, 4.- *Pisum sativum*, 5.- *Loa loa*, 6.- *Ophiocordyceps unilateralis*, 7.- *Pyrus communis*, 8.- *Cupressus sempervirens* y 9.- *Lilium longiflorum*. C: secuencia consenso.

Finalmente, la diferencia en los valores de nivel relativo de transcritos de los genes entre las condiciones estudiadas, se evaluó mediante ANOVA, y posteriormente con la prueba de Tukey, empleando el programa Minitab 16[®], considerando un valor $P < 0,05$ como significativo.

Extractos proteicos para ensayos enzimáticos

Se obtuvieron extractos proteicos a partir de los especímenes bajo desecación *in vitro* pertenecientes a las cuatro especies macroalgales en estudio, de acuerdo a Contreras y cols. (2005). Las muestras se congelaron y pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana, para posteriormente ser homogeneizadas con 20 mL de amortiguador (Fosfato 0,1 M pH 7, 2-mercaptoetanol 5 mM). El homogeneizado se filtró a través de papel Miracloth (Calbiochem, EEUU) y se centrifugó a 1800 x g durante 30 min a 4 °C. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con sulfato de amonio 0,5 gr/ml extracto durante 2 h a 4 °C y se recuperaron mediante centrifugación (1 h, 1800 x g, 4 °C). El precipitado se re-suspendió en amortiguador fosfato y se centrifugó (1 h, 1800 x g, 4 °C). Finalmente, el precipitado se solubilizó en 1 mL de amortiguador fosfato. La concentración de los extractos proteicos se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Walker 2002), utilizando como estándar la proteína albúmina de suero bovino (BSA). Este método se basa en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en un medio alcalino o reacción de Biuret. En la reacción, el Cu^{+1} forma un complejo con dos moléculas de BCA,

generando un color violeta, con un máximo de absorbancia a 562 nm, el cual es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

Actividad trehalosa fosfato sintasa (TPS)

El ensayo para actividad TPS se diseñó bajo este proyecto de tesis (Anexo 2), en el cual se registró la aparición del compuesto 2,4 dinitrofenilhidrazona de piruvato, de color rojo-anaranjado, formado por piruvato y 2,4 dinitrofenilhidrazina en medio alcalino (Schwimmer y Weston 1961) (Anexo 1, Esquema 1). Para generar el piruvato necesario para la reacción de cuantificación, la reacción de TPS se acopló a la reacción de la enzima piruvato kinasa (Cabib y Leloir 1958). La medición se realizó en 100 μ L de reacción en los cuales se incubaron 15 μ g de extracto de proteínas durante 15 min a 37 °C en presencia de UDP-glucosa 5 mM, glucosa 6 fosfato 10 mM, sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 25 mM y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 10 mM. Las reacciones control contenían los mismos reactivos excepto que la glucosa 6 fosfato fue agregada luego de la incubación. Posteriormente, las muestras se calentaron durante 3 min a 100 °C. Al enfriarse, se agregó fosfoenolpiruvato (PEP) 60 mM, 1 U de la enzima piruvato kinasa y las muestras se incubaron 15 min a 37 °C. Para detener la reacción se agregó 1 mL de ácido tricloro acético (TCA) 10 % y se centrifugó a 7700 x g durante 10 min. Posteriormente, a una alícuota de 300 μ L del sobrenadante se le agregó 300 μ L de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNFH) 0,6 mM preparada en HCl 2 N y 400 μ L de

hidróxido de sodio (NaOH) 1 N. La presencia del compuesto coloreado se determinó en un espectrofotómetro UV/Visible Smartspect 3000 (BioRad) a 450 nm, utilizando para la cuantificación una curva de calibración con ácido pirúvico en el rango de 1-20 nM (Anexo 2).

Actividad piruvato deshidrogenasa (PDH)

La implementación de la técnica para la determinación de la actividad PDH se realizó durante la presente tesis (Anexo 2), basándose en lo descrito por Szutowicz y cols. (1981). Mediante un ensayo acoplado a la enzima citrato sintasa (Anexo 1, Esquema 2). En 1 mL de reacción se añadieron 15 µg de extracto de proteínas, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, piruvato de sodio 10 mM, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) 2 mM, tiamina pirofosfato (TPP) 2 mM, cloruro de magnesio (MgCl₂) 1 mM, ditioneitol (DTT) 10 mM y coenzima A 0,2 mM. Para cada muestra se realizó además una reacción control en ausencia de coenzima A. Las mezclas de reacción se incubaron durante 15 min a 37 °C y luego se añadió a cada una ácido oxalacético (OAA) 2,5 mM y 5'-ditiobis-(2- ácido nitrobenzoico) (DTNB) 0,013 %, los cuales se dejaron estabilizar (20 °C, 10 min). Finalmente, se agregaron 4 U de la enzima citrato sintasa (C3260) y se monitoreó el aumento en la absorbancia dada por el anión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB), producto de la reducción del compuesto DTNB al interactuar con la Coenzima A formada. La medición se realizó en un espectrofotómetro UV/Visible Smartspect 3000 (BioRad) a una longitud de onda

de 412 nm. La actividad enzimática se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar para TNB ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Actividad peroxirredoxina (PRX)

La actividad PRX se midió registrando la concentración del complejo ferrotiocianato de color rojo, el cual se forma en presencia de peróxidos (Lovazzano y cols. 2013) (Anexo 1, Esquema 3). El consumo de H_2O_2 , causado por la actividad PRX, es responsable de la disminución del complejo de ferrotiocianato. Para realizar la medición, 50 μg de extracto de proteínas se incubaron durante 30 min a 37 °C en presencia de ditioneitol (DTT) 0,2 mM preparado en amortiguador fosfato 0,1 M pH 7. Luego de la incubación, la reacción se inició agregando H_2O_2 50 μM y se detuvo 30 min después, agregando ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Luego, se centrifugó a 7700 x g por 10 min y se tomaron 700 μL del sobrenadante, a los cuales se agregaron 200 μL de sulfato de amonio ferroso ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) 10 mM y 100 μL de tiocianato de potasio (KSCN) 2,5 M. La presencia del complejo ferrotiocianato se determinó en un espectrofotómetro UV/Visible Smartspect 3000 (BioRad) a una longitud de onda de 480 nm, utilizando para la cuantificación de los peróxidos una curva de calibración con H_2O_2 en el rango de 1 -100 μM .

Actividad tiorredoxina (TRX)

Este ensayo se diseñó durante el desarrollo de esta memoria (Anexo 2) y se determinó monitoreando la formación del anión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB)

producido por la reducción de 5'-ditiobis-(2- ácido nitrobenzoico) (DTNB) (Arnér y Holmgren 2000) (Anexo 1, Esquema 4). En 50 μL de reacción se añadieron HEPES 85 mM pH 7,6, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 3 mM, dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADPH) 660 μM , insulina 0,3 mM, 10 μg de extracto de proteínas y la enzima tiorredoxina reductasa (TRXR) 50 nM. Para cada muestra se realizó además un control sin TRXR. Las mezclas de reacción se incubaron durante 20 min a 37 °C y luego, se añadieron 500 μL de DTNB 1 mM en clorhidrato de guanidina 5,4 M. Posteriormente las muestras se midieron en espectrofotómetro UV/Visible Smartspect 3000 (BioRad) a una longitud de onda de 412 nm, utilizando para la cuantificación el coeficiente de extinción molar para TNB ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Actividad catalasa (CAT)

La descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se determinó según lo descrito por Aebi 1984. Para esto, se mezcló entre 75 -100 μg de extracto de proteínas con amortiguador fosfato 0,1 M pH 7 a 37°C y H_2O_2 10 – 15 mM en un volumen final de 1 mL (Anexo 1, Esquema 5). Posteriormente, la disminución en la absorbancia fue monitoreada en un espectrofotómetro UV/Visible Smartspect 3000 (BioRad) a una longitud de onda de 240 nm durante 5-10 min. La actividad enzimática fue calculada utilizando el coeficiente de extinción para H_2O_2 . ($\epsilon=39,4\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

III. RESULTADOS

Grado de desecación

Para determinar la variación del contenido intracelular de agua en la especie *Pyropia columbina* durante el ciclo de marea, se determinó el contenido de relativo de agua (CRA) presente en la fase hidratación, desecación y re-hidratación. Los resultados evidencian que la especie perdió un 88 % del contenido intracelular de agua a la cuarta hora de estrés y recuperó el 99 % de ésta durante la segunda hora de re-hidratación (Figura 6).

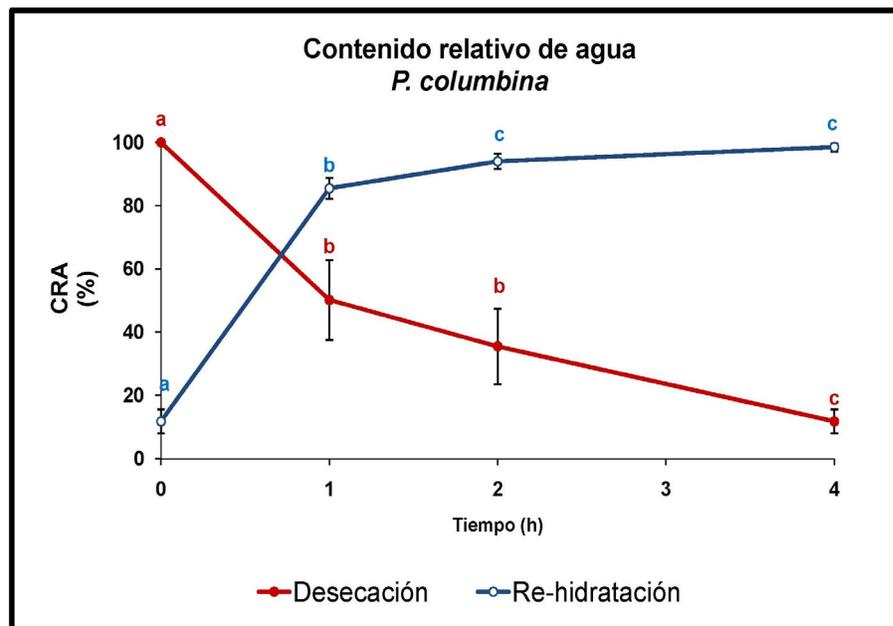


Figura 6. Contenido relativo de agua (CRA) en *P. columbina* bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural. n=3, ANOVA, Tukey. Para cada curva analizada, las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos, mientras que letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas.

Cinética de mRNA de genes de tolerancia en *P. columbina* bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural

Eficiencia y especificidad de las reacciones de qPCR

La eficiencia de amplificación para los transcritos de los genes estudiados, se determinó experimentalmente mediante la construcción de una curva estándar. El gráfico lineal generado por el ciclo umbral de amplificación vs el logaritmo de la concentración de muestra, permitió obtener la pendiente de la recta, la cual corresponde a la eficiencia de amplificación (Tabla 2). Los transcritos se cuantificaron sólo si sus eficiencias fluctuaban entre $100 \pm 10\%$.

Tabla 2. Genes estudiados en *P. columbina*: categoría funcional, eficiencias de amplificación, longitud y temperatura de *melting* de los fragmentos

Gen	Categoría funcional	Sigla	Eficiencia (%)	Fragmento (pb)	Tm fragmento (°C)
<i>proteína asociada a senescencia</i>	Control endógeno	<i>sen</i>	109	114	77,6
<i>trehalosa fosfato sintasa</i>	Metabolismo basal	<i>tps</i>	100	146	72,6
<i>piruvato deshidrogenasa</i>	Metabolismo basal	<i>pdh</i>	98	164	71,7
<i>peroxirredoxina</i>	Metabolismo antioxidante	<i>prx</i>	108	148	70,6
<i>tiorredoxina</i>	Metabolismo antioxidante	<i>trx</i>	95	156	70,4
<i>catalasa</i>	Metabolismo antioxidante	<i>cat</i>	95	154	74,6

Para evaluar si la amplificación de los transcritos de cada gen fue específica, se realizó un análisis de curva de *melting*. En la Tabla 2 se detallan las temperaturas de *melting* para cada amplicón y la Figura 7 muestra las curvas de *melting*, en las cuales se observa un valor máximo de fluorescencia

único para la amplificación de cada cDNA. Por ejemplo, para el transcrito producto del gen *sen* y utilizado como control endógeno, se observó un nivel máximo de fluorescencia a los 77,6 °C, lo que indica un único producto de amplificación. A su vez no se observó un aumento similar en el control negativo, al utilizar agua en vez de cDNA.

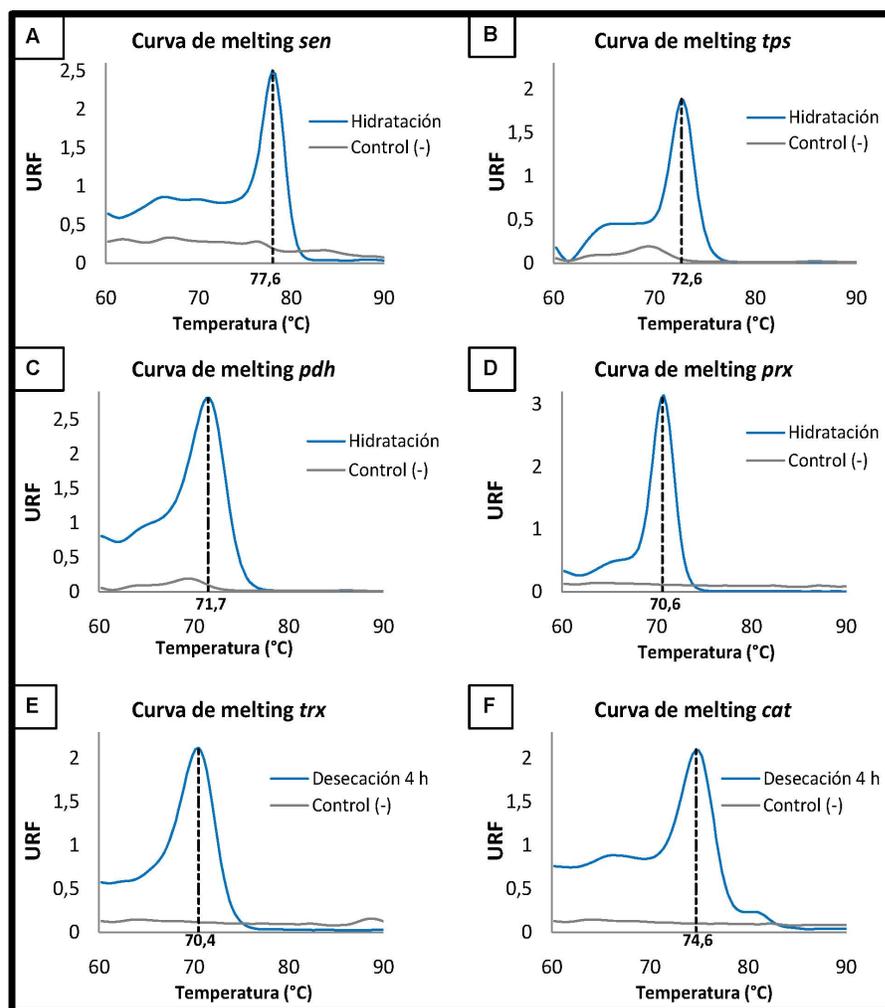


Figura 7. Curvas de *melting* para los transcritos de los genes de tolerancia evaluados en *P. columbina*. A. control endógeno (*sen*), B. *trehalosa fosfato sintasa* (*tps*), C. *piruvato deshidrogenasa* (*pdh*), D. *peroxirredoxina* (*prx*), E. *tiorredoxina* (*trx*) y F. *catalasa* (*cat*). URF: unidades relativas de fluorescencia.

Estabilidad y especificidad de *sen*, utilizado como control endógeno, en los distintos tratamientos experimentales

Con la finalidad de validar el control endógeno elegido para la realización de la cuantificación relativa de los mRNA de los genes de interés, se evaluó el nivel de transcritos del gen que codifica para la proteína asociada a senescencia (*sen*) en los distintos tratamientos experimentales. La variación máxima registrada para este gen fue 2,2 ciclos entre las condiciones control (i.e. hidratación) y re-hidratación luego de 2 h. Con respecto a la especificidad, la curva de *melting* mostrada en la Figura 7 A, se repitió en todas las condiciones experimentales. Ambas observaciones son congruentes con lo esperado para un control endógeno, y permitieron validar el uso del nivel de mRNA de *sen* como un normalizador.

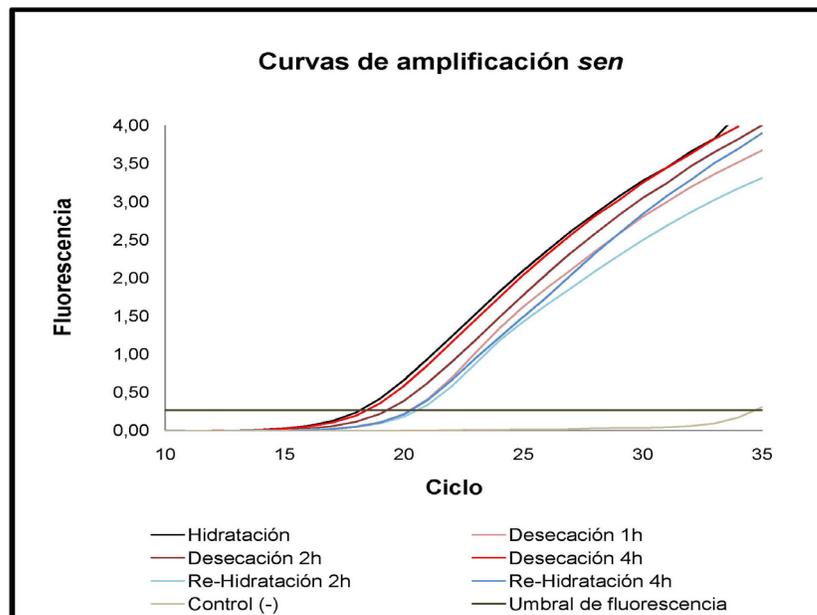


Figura 8. Curvas de amplificación para el control endógeno (*sen*) en las distintas condiciones experimentales.

Nivel relativo de transcritos de genes asociados al metabolismo basal en *P. columbina*

Bajo la categoría funcional metabolismo basal, fueron analizados los niveles de mRNAs de los genes: *trehalosa fosfato sintasa* y *piruvato deshidrogenasa*, ambos identificados en la librería de hidratación.

Los niveles relativos de mRNA del gen *trehalosa fosfato sintasa (tps)* aumentaron 40 veces con respecto a hidratación en la primera hora de desecación ($t=13,14$ $P<0,001$) (Figura 9 A) y alcanzaron su máximo durante la segunda hora de desecación, el cual fue 69 veces mayor de lo registrado en la condición hidratación ($t=20,23$ $P<0,001$). Se registró además una disminución del 50 % de los niveles de transcritos registrados entre la primera y cuarta hora de desecación ($t=6,28$ $P<0,001$). Posteriormente hacia las cuatro horas de re-hidratación, los niveles de mRNA disminuyeron a valores cercanos a los registrados durante desecación 4 h. Con respecto al gen *piruvato deshidrogenasa (pdh)*, el aumento de transcritos más significativo se registró a las dos horas de re-hidratación, condición en la cual los niveles fueron 30 y 10 veces mayor que los registrados durante hidratación ($t=43,37$ $P<0,001$) y desecación 4 h ($t= 13,38$ $P<0,001$), respectivamente. A diferencia de lo registrado para el gen *tps*, no hubo un aumento importante en los niveles de mRNA de *pdh* durante la primera hora de desecación. Finalmente, a las cuatro horas de re-hidratación los niveles de transcritos disminuyeron hacia un valor similar al del control hidratado. En este contexto, los mRNA de genes relacionados con metabolismo basal mostraron diferentes niveles durante el

ciclo desecación y re-hidratación. Mientras ambos alcanzan su máximo durante las primeras horas de re-hidratación y disminuyen durante las últimas horas de estrés, *tps* mostró un mayor aumento durante la primera hora de desecación. Estas observaciones nos indican que probablemente la expresión diferencial de estos genes sería importante en diferentes etapas del ciclo baja-alta marea.

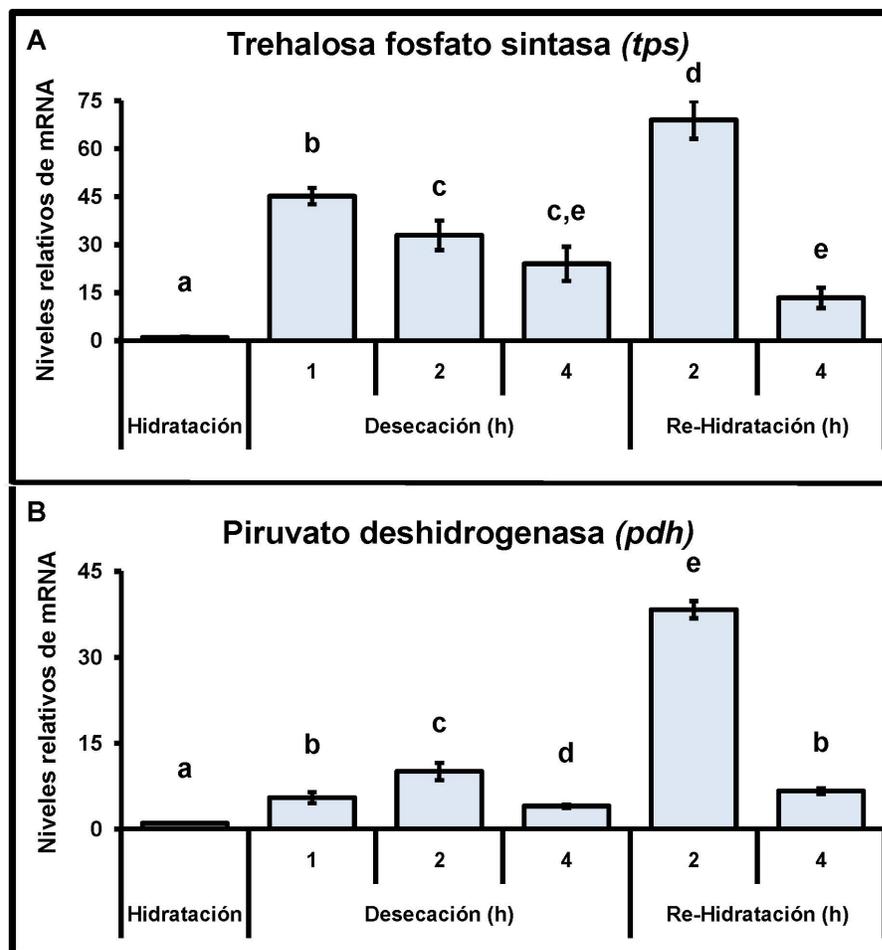


Figura 9. Niveles relativos de transcritos para *trehalosa fosfato sintasa (tps)* (A) y *piruvato deshidrogenasa (pdh)* (B) en *P. columbina* bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural. n=3, ANOVA, Tukey. En cada caso, las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las comparaciones realizadas entre los tratamientos experimentales.

Nivel relativo de transcritos de genes asociados al metabolismo antioxidante en *P. columbina*

En la categoría funcional metabolismo antioxidante se analizaron los niveles de mRNA de los genes *peroxirredoxina* (*prx*), *tiorredoxina* (*trx*) y *catalasa* (*cat*), cuyos productos génicos han sido descritos como moderadores de las EROs generadas durante desecación.

Los niveles de transcritos para *peroxirredoxina* (*prx*) aumentaron 6 veces durante la primera hora de desecación con respecto a hidratación ($t= 6,369$ $P<0,05$) (Figura 10 A). Sin embargo en horas posteriores de exposición a estrés, los valores retornaron a niveles cercanos a hidratación. Los niveles máximos de transcritos de *prx* se registraron durante la segunda hora de re-hidratación ($t= 11,015$ $P<0,05$ con respecto a hidratación). En cambio en las horas finales de re-hidratación (4 h), estos disminuyeron a un valor que no registró diferencias significativas con la cuarta hora de desecación ($t= 2,90$ $P=0,105$). Por otro lado, los niveles de mRNA de *tiorredoxina* (*trx*) fueron 20 veces mayor durante la primera hora de desecación con respecto a hidratación ($t=10,42$ $P<0,001$) (Figura 10 B) y a diferencia de *prx*, en las horas posteriores de estrés se observó un aumento de los transcritos, que se mantuvo hasta la segunda hora de re-hidratación. Finalmente, los niveles relativos de mRNA de *catalasa* (*cat*) fueron similares a los observados para *trx*, en donde se registró un aumento de 5 veces en la primera hora de desecación en relación al control ($t=3,539$ $P<0,050$) (Figura 10 C).

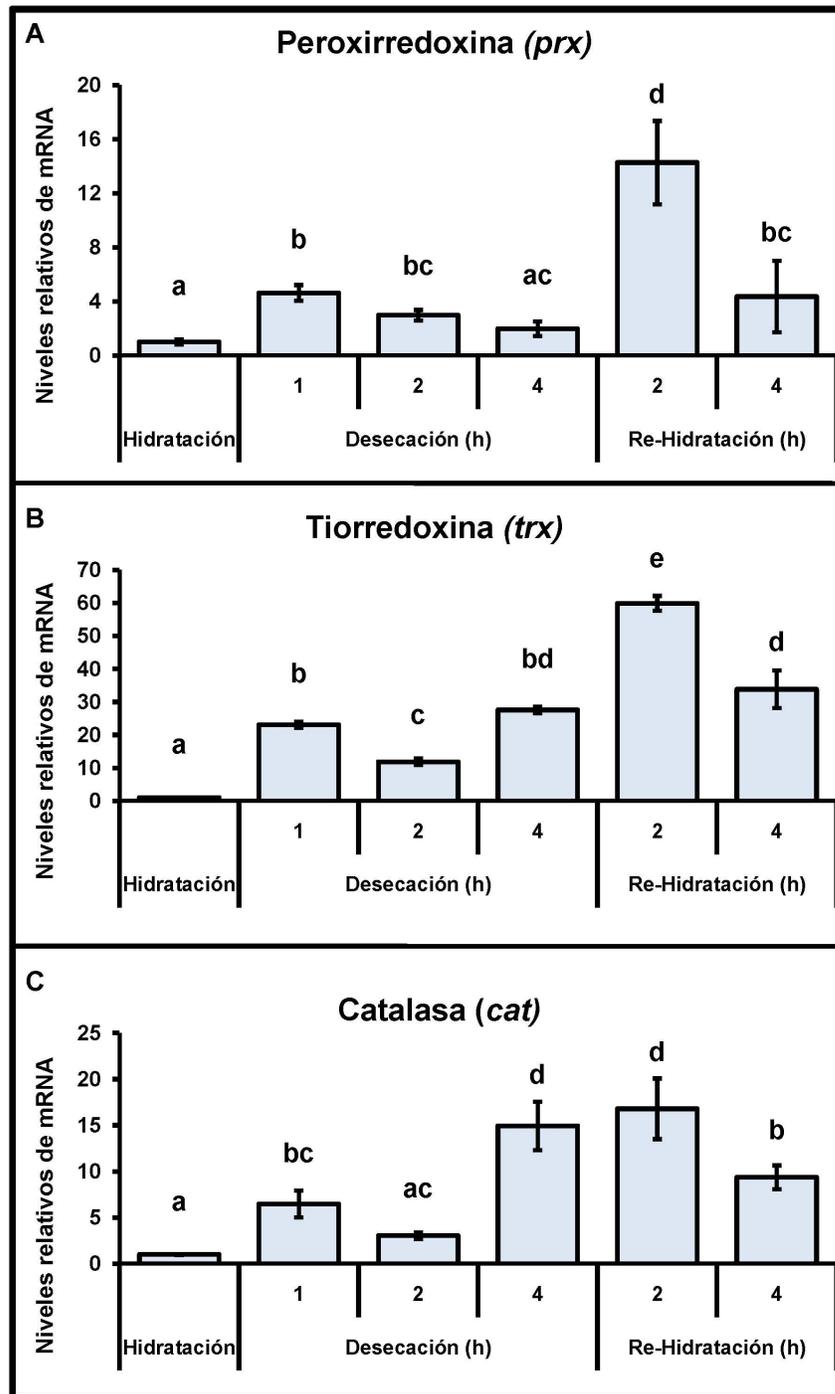


Figura 10. Niveles relativos de transcritos de *peroxirredoxina (prx)* (A) *tiorredoxina (trx)* (B) y *catalasa (cat)* (C) en *P. columbina* bajo el ciclo de desecación y re-hidratación natural. n=3, ANOVA, Tukey. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) para las comparaciones entre los distintos tratamientos experimentales.

En horas posteriores de estrés, los niveles de transcritos volvieron a aumentar alcanzando un máximo a la cuarta hora de desecación ($t=9,01$ $P<0,001$), el cual se mantuvo constante hasta la segunda hora de re-hidratación. Los niveles de mRNA de *prx* aumentaron levemente durante todas las horas de desecación, alcanzando un máximo durante re-hidratación. Por otra parte, los niveles de mRNAs de los genes *trx* y *cat* aumentaron paulatinamente hasta la cuarta hora de desecación o la segunda hora de re-hidratación. Estas observaciones indican que efectivamente se genera un aumento diferencial de los transcritos de genes antioxidantes durante desecación y que no todos los genes analizados tendrían la misma importancia durante el ciclo de desecación y re-hidratación natural.

Comparación funcional de los genes de tolerancia a desecación entre *Pyropia columbina* y las especies sensibles *Mazzaella laminarioides*, *Scytosiphon lomentaria* y *Lessonia spicata*

Para determinar si los mecanismos de tolerancia presentes en la especie *P. columbina* se encuentran activos en las macroalgas que habitan la zona intermareal media y baja, se determinó mediante actividad enzimática, la funcionalidad de los productos génicos asociados a: trehalosa fosfato sintasa, piruvato deshidrogenasa, peroxirredoxina, tiorredoxina y catalasa en las especies sensibles.

Actividad enzimática trehalosa fosfato sintasa (TPS)

La mayor actividad TPS se registró en la especie *P. columbina* bajo desecación 1 h al compararla con cualquier condición experimental en las especies sensibles ($P < 0,005$ para todas las comparaciones) (Figura 11). Por otro lado, la especie tolerante mostró una disminución gradual de la actividad enzimática desde su máximo a la primera hora de desecación hasta la segunda hora de re-hidratación ($P < 0,001$ entre desecación 1 h y re-hidratación 2 h) y se mantuvo en ese nivel hasta las cuatro horas de re-hidratación ($P \geq 0,05$ entre rehidratación 2 y 4 h).

Con respecto a las especies sensibles, en *M. laminarioides* sólo hubo un aumento de la actividad TPS durante la segunda hora de desecación al compararla con hidratación ($t = 3,479$ $P < 0,05$), sin registrarse diferencias significativas entre la condición control y el resto del ciclo ($P \geq 0,05$ para todas las comparaciones). Las especies que habitan las zonas más bajas del intermareal mostraron inhibición y disminución de la actividad TPS durante el ciclo de desecación y re-hidratación con respecto a los niveles registrados durante hidratación. En el caso de *S. lomentaria*, no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales ($P \geq 0,05$ para todas las comparaciones) y en *L. spicata* no se observaron variaciones significativas entre la mayoría de los tratamientos, sin embargo a las cuatro horas de desecación la actividad fue la mitad de la registrada bajo hidratación ($t = 3,601$ $P < 0,05$).

Por otra parte, la especie tolerante activaría la síntesis de trehalosa durante las horas de desecación, lo cual le permitiría estabilizar macromoléculas, mientras que las especies sensibles no poseerían una capacidad similar. A medida que las especies habitan las zonas más bajas del intermareal, la actividad TPS durante las horas en que la marea baja y se produce desecación fue menor.

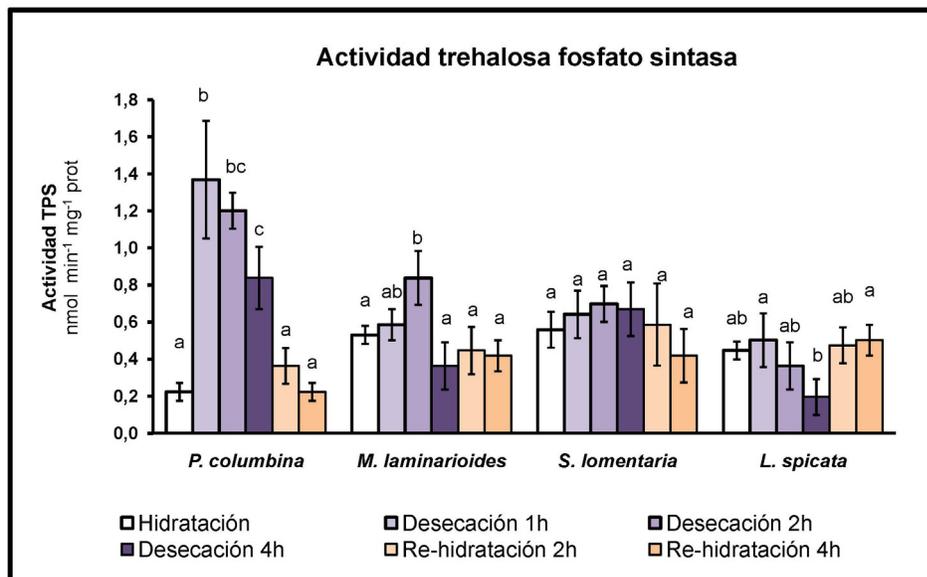


Figura 11. Actividad enzimática trehalosa fosfato sintasa (TPS) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación i.e. *P. columbina*, *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata*. n=3, ANOVA, Tukey. Para cada especie, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las comparaciones entre los distintos tratamientos experimentales.

Actividad enzimática piruvato deshidrogenasa (PDH)

Los niveles más altos de actividad PDH se registraron en la especie *P. columbina*, específicamente en la condición de re-hidratación 2 h; este valor fue mayor que el registrado en cualquier otra condición experimental en las

especies sensibles ($P < 0,05$ para todos los casos) (Figura 12). Por otro lado, las especies sensibles mostraron inhibición de la enzima PDH en distintas etapas del ciclo desecación y re-hidratación analizado. En la especie *M. laminarioides*, la actividad PDH disminuyó a la mitad de la registrada durante hidratación al desecar el organismo durante 4 horas ($t = 11,33$ $P < 0,001$) y se mantuvo en ese nivel hasta la cuarta hora de re-hidratación. En el caso de *S. lomentaria*, la actividad PDH se mantuvo constante en casi todas las condiciones ensayadas ($P \geq 0,05$ para todos los casos), evidenciándose una disminución del 50% de la actividad enzimática registrada bajo desecación 4 h durante la segunda hora de re-hidratación ($t = 4,32$ $P < 0,05$).

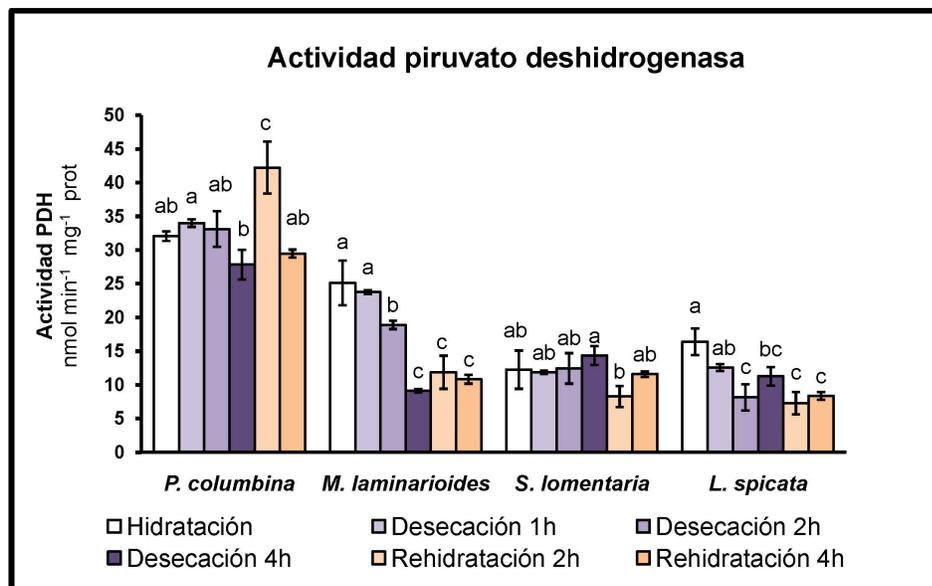


Figura 12. Actividad enzimática piruvato deshidrogenasa (PDH) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación i.e. *P. columbina*, *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata*. $n=3$, ANOVA, Tukey. Para cada especie, las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las comparaciones entre los tratamientos experimentales.

Finalmente, para *L. spicata* la actividad PDH disminuyó a la mitad de la registrada durante hidratación bajo desecación por dos horas ($t= 6,91$ $P<0,005$), sin registrarse diferencias entre esta condición y el resto del ciclo de desecación y re-hidratación ($P\geq 0,05$ para todas las condiciones). Por lo tanto, estos resultados indican que las especies sensibles poseen menores niveles de actividad enzimática PDH que la especie tolerante, evidenciándose una correlación entre la ubicación de las especies en la zona intermareal y la actividad PDH durante el ciclo desecación y re-hidratación

Actividad enzimática peroxirredoxina (PRX)

La mayor actividad PRX se registró en *P. columbina* bajo desecación 4 h, la cual fue 2 a 3 veces mayor que lo observado bajo la misma condición en las especies sensibles *M. laminarioides* ($t=6,41$ $P<0,001$), *S. lomentaria* ($t=4,56$ $P<0,050$) y *L. spicata* ($t=9,67$ $P<0,001$) (Figura 13). La actividad PRX de *P. columbina* en comparación con hidratación, fue el doble durante desecación 1 h ($t=4,05$ $P<0,05$) y desecación 2 h ($t=3,32$ $P<0,05$), sin observarse diferencias significativas entre hidratación y ambas condiciones de re-hidratación ($P\geq 0,05$ para ambos casos). En la especie *M. laminarioides* la actividad PRX aumentó al doble en la primera hora de desecación con respecto al control ($t=4,93$ $P<0,005$), sin registrarse diferencias significativas entre todas las condiciones de desecación y re-hidratación ($P\geq 0,50$ en todos los casos) (Figura 13).

Finalmente, los valores de actividad enzimática en el caso de *S. lomentaria* y *L. spicata*, no mostraron diferencias significativas entre todos los tratamientos experimentales ($P \geq 0,50$ en todos los casos) (Figura 13). Estos resultados indican que la atenuación de peróxidos, catalizada por la enzima peroxirredoxina, sería mayor en la especie tolerante. Adicionalmente, en las especies que habitan las zonas más bajas del intermareal, ocurriría inhibición enzimática.

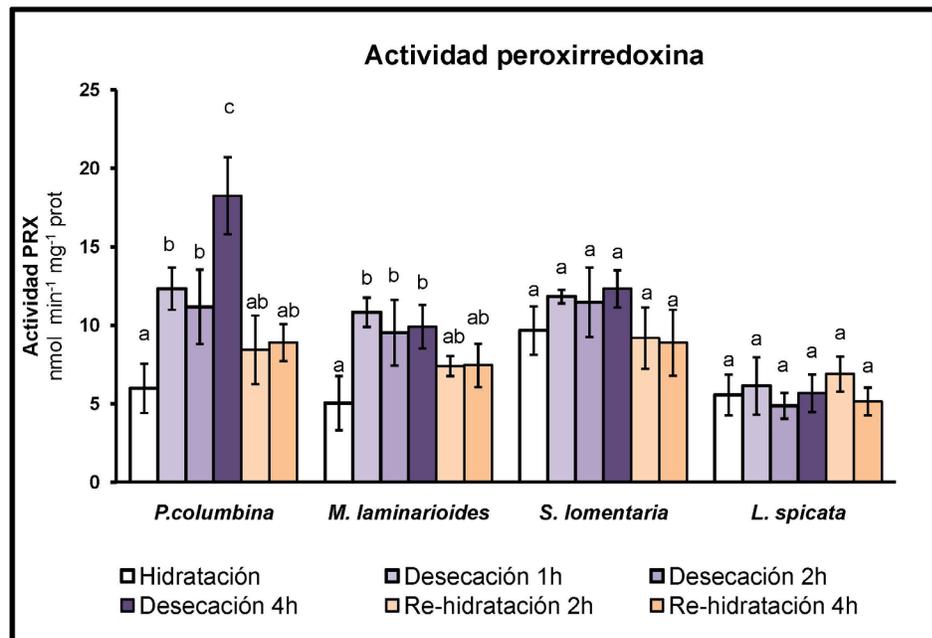


Figura 13. Actividad enzimática peroxirredoxina (PRX) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación i.e. *P. columbina*, *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata*. $n=3$, ANOVA, Tukey. Para cada especie, las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las comparaciones entre los tratamientos experimentales.

Actividad enzimática tiorredoxina (TRX)

Durante hidratación la actividad TRX observada fue igual en todas las especies ($P \geq 0,05$ entre hidratación de todas las especies) (Figura 14). Sin

embargo, *P. columbina* mostró la mayor magnitud de actividad de TRX a las cuatro horas de desecación. En comparación con la condición control, la actividad fue 3 veces mayor con respecto a *S. lomentaria* ($t=9,22$ $P<0,001$) y 1,6 veces mayor con respecto a *M. laminarioides* ($t=4,61$ $P<0,005$) y *L. spicata* ($t=5,01$ $P<0,005$). La actividad TRX en *P. columbina* aumentó al doble durante la segunda hora de desecación ($t=3,58$ $P<0,05$) y alcanzó un máximo a la cuarta hora de estrés, el cual se mantuvo hasta las últimas horas de rehidratación ($P\geq 0,05$ para ambos casos) (Figura 14).

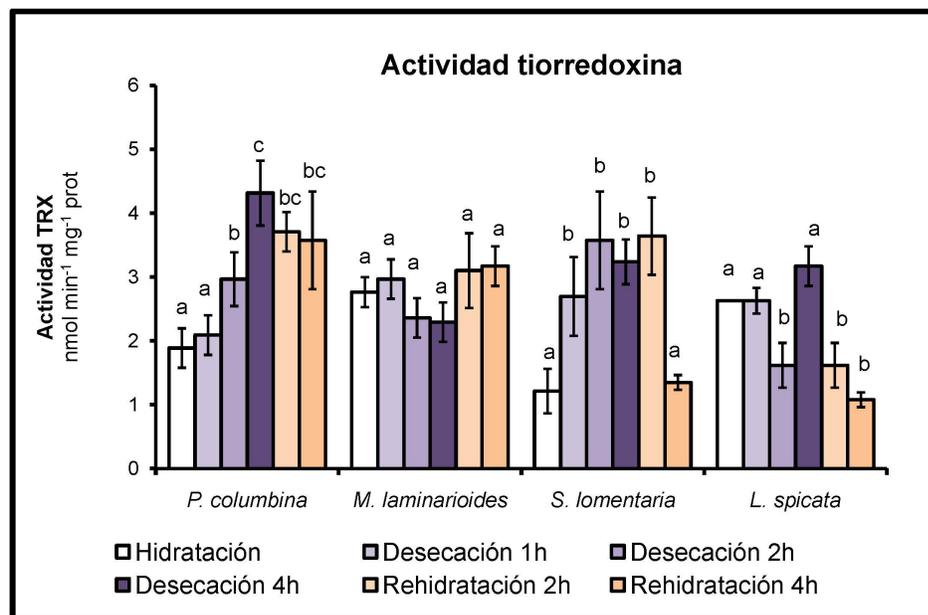


Figura 14. Actividad enzimática tiorredoxina (TRX) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación i.e. *P. columbina*, *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata*. $n=3$, ANOVA, Tukey. Para cada especie, las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P<0,05$) en las comparaciones entre los tratamientos experimentales.

En el caso de las especies sensibles, en *M. laminarioides* se observó inhibición enzimática, evidenciada por la nula variación en la actividad en las

distintas condiciones experimentales ($P \geq 0,5$ para todos los casos). En *S. lomentaria* la actividad TRX aumentó 2,5 veces durante la primera hora de desecación con respecto al control ($t=3,52 P < 0,05$) y se mantuvo en ese nivel hasta la segunda hora de re-hidratación ($P \geq 0,05$ en todos los casos). Durante re-hidratación 4 h, la actividad TRX retornó al valor registrado durante hidratación ($t=0,32 P \geq 0,5$). Al comparar con hidratación, *L. spicata* no mostró activación de esta enzima durante las horas de desecación ($P \geq 0,05$ para ambas), e incluso se observó una disminución de la actividad enzimática durante la segunda hora de estrés ($t= 4,83 P < 0,005$), la cual fue observada también durante las horas de re-hidratación. En este contexto, la alta actividad TRX registrada en la especie tolerante durante las últimas horas de desecación y durante re-hidratación, le permitirían mantener diversas enzimas en su forma reducida activa, mientras que las especies sensibles que habitan las zonas más bajas del intermareal serían incapaces de activar esta vía de recuperación enzimática.

Actividad enzimática catalasa (CAT)

Pyropia columbina registró niveles de actividad CAT dos a cuatro veces mayores durante desecación 4 h en relación a cualquier condición analizada en las especies sensibles ($P < 0,005$ en todos los casos). En todas las especies los valores más altos de actividad se registraron a las cuatro horas de desecación con respecto a hidratación ($P < 0,05$ para todos los casos) (Figura 15). En *P. columbina* la actividad CAT aumentó al doble de la registrada durante

hidratación al someter al organismo a dos horas de estrés ($t=4,98$ $P<0,050$), alcanzando la máxima activación a las cuatro horas. Durante todas las horas de re-hidratación, la actividad CAT fue menor que la registrada durante la cuarta hora de desecación ($P<0,005$ para ambas comparaciones). Para las especies *M. laminarioides* y *S. lomentaria*, las cuales habitan la zona media-alta y media del intermareal respectivamente, la actividad CAT aumentó al doble de la registrada bajo hidratación al desecar los organismos durante cuatro horas ($t=3,53$ $P<0,050$ para *M. laminarioides*) y ($t=4,69$ $P<0,005$ para *S. lomentaria*). En el caso de *M. laminarioides* la actividad se mantuvo sin variación hasta las horas finales de re-hidratación ($P\geq 0,5$ para ambas condiciones de re-hidratación), mientras que en *S. lomentaria* se observó una disminución de la actividad durante las últimas horas de re-hidratación. Finalmente en *L. spicata*, la cual presenta una distribución en la zona baja del intermareal, la actividad de esta enzima fue el doble en todas las condiciones experimentales con respecto a hidratación ($P<0,05$ para todas las comparaciones). En base a estos resultados, todas las especies analizadas poseerían la capacidad de atenuar en cierto grado el peróxido de hidrógeno generado durante el estrés por desecación. Sin embargo, esta atenuación sería mayor en las macroalgas que habitan las zonas más altas del intermareal rocoso.

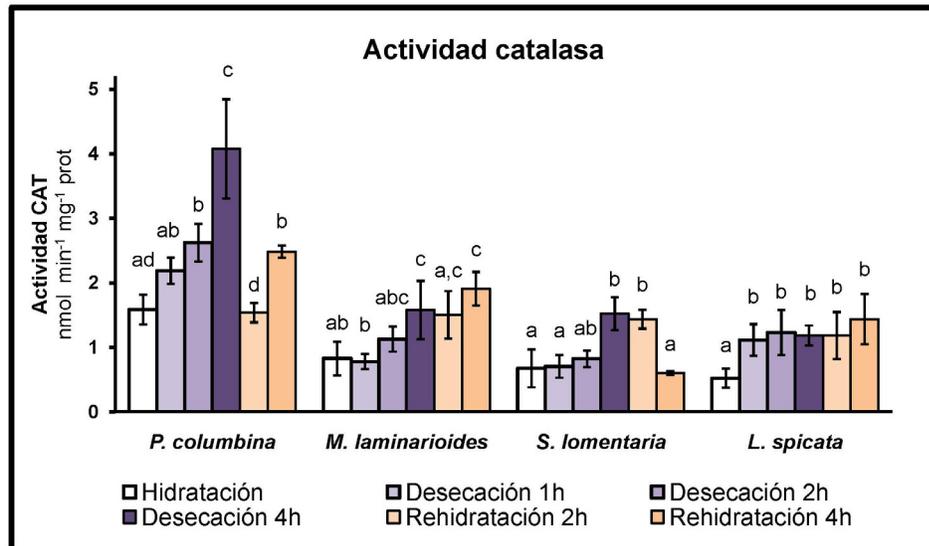


Figura 15. Actividad enzimática catalasa (CAT) en las cuatro especies estudiadas bajo estrés por desecación i.e. *P. columbina*, *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata*. n=3, ANOVA, Tukey. Para cada especie, las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las comparaciones entre los tratamientos experimentales

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten aceptar ambas hipótesis de trabajo. Existe una expresión diferencial de genes de tolerancia en *Pyropia columbina* en las distintas etapas del ciclo natural de desecación y re-hidratación. Por otro lado, la comparación funcional entre *P. columbina* y las macroalgas sensibles (i.e. *M. laminarioides*, *S. lomentaria*, *L. spicata*), mostró diferencias significativas durante el estrés por desecación *in vitro*. Ambas hipótesis en conjunto, ayudan a explicar la ubicación de las especies a lo largo de la zona intermareal y además, comprender parte de los mecanismos de tolerancia presentes en *P. columbina* bajo la condición de estrés por desecación.

Transcripción y funcionalidad de los genes en *P. columbina*

Genes asociados al metabolismo basal: trehalosa fosfato sintasa y piruvato deshidrogenasa

La enzima trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) codificada por el gen *tps*, pertenece a la vía de síntesis del disacárido no reductor trehalosa formado a partir de dos moléculas de glucosa (Godijn y van Dun 1999; El-Bashiti y cols. 2005). Este azúcar puede ser producido en diferentes organismos (Grennan 2007), en los cuales podría actuar como una molécula de reserva energética y/o como un potente estabilizador de membranas y macromoléculas (Godijn y van Dun 1999; França y cols. 2007; Grennan 2007). En la macroalga roja *Pyropia columbina* se observó una expresión diferencial del gen *tps*. El rápido aumento

en los niveles de mRNA y actividad registrados durante la primera hora de desecación, son congruentes con lo observado bajo este estrés en organismos desérticos como la planta *Selaginella lepidophylla*, algunas levaduras y la variedad de trigo harinero *Triticum aestivum*, en las cuales se ha detectado un aumento tanto del disacárido (i.e. trehalosa) como también de la enzima sintetizadora (i.e. TPS) (Goddijn y van Dun 1999; França y cols. 2007; Pandey y cols. 2010). En este contexto, observaciones realizadas en levaduras, indican que el aumento en los niveles de trehalosa se relacionan con mayor tolerancia a condiciones ambientales y con la modulación de la glicólisis, la cual ocurre mediante la inhibición de la enzima hexoquinasa (Thevelein y Hohmann 1995; Goddijn y van Dun 1999; Wingler 2002; Grennan 2007). Durante re-hidratación la síntesis de trehalosa estaría volviendo a niveles basales, lo cual fue evidenciado por una disminución en los niveles de transcritos y actividad enzimática a las cuatro horas de re-hidratación. Si bien la trehalosa ha sido descrita como un azúcar estabilizador, no es el único. Una serie de plantas vasculares entre las que se encuentra la hierba de resurrección *Sporobolus stapfianus* y la planta *Haberlea rhodopensis*, desvían su metabolismo glicolítico hacia la síntesis de sacarosa en vez de trehalosa al ser sometidas a estrés por desecación (Goddijn y van Dun 1999; Whittaker y cols. 2007; Gechev y cols. 2013). Luego, el gen *tps* cambiaría su expresión durante el ciclo baja-alta marea según las necesidades celulares de estabilización de membranas y macromoléculas.

El complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH), compuesto por las enzimas piruvato descarboxilasa (E1), dihidrolipoil transacetilasa (E2) y dihidrolipoil deshidrogenasa, corresponde a un complejo esencial en el metabolismo basal de los organismos fotosintéticos, ya que la descarboxilación oxidativa de piruvato para formar acetil CoA, determina la entrada del carbono al ciclo del ácido cítrico. Esta vía genera como producto final ATP y poder reductor en la forma de NADH y FADH₂ (Lehninger 2008). En la especie *P. columbina*, los niveles de mRNA del gen *pdh*, que codifica para la primera enzima del complejo (i.e. piruvato descarboxilasa), cambiaron en todas las condiciones evaluadas. El aumento de los transcritos de *pdh* observado durante la primera hora de desecación, es congruente con la demanda celular durante el periodo de aclimatación a desecación. Esta observación se respalda por la evidencia registrada en una especie de trigo de genotipo tolerante a desecación, en la cual la transcripción del gen asociado a la primera enzima del complejo PDH y a la enzima málica NADP (NADP-ME) aumenta bajo estrés. Las enzimas asociadas a estos genes, le permitirían al organismo generar esqueletos carbonados para la síntesis de moléculas que permiten cambios metabólicos, detoxificación y estabilidad celular necesaria durante desecación (Guo y cols. 2009). Sin embargo la actividad PDH se mantuvo sin cambios hasta la cuarta hora de desecación, lo cual podría deberse a diversos factores. Por ejemplo, en plantas vasculares bajo estrés abiótico, se ha observado una inactivación mediada por EROs de componentes derivados del ácido lipoico,

esenciales en el funcionamiento del complejo piruvato deshidrogenasa (Rapala-Kozic y cols. 2008), y mayor actividad de enzimas como fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato fosfato dikinasa, las cuales pertenecen a vías celulares que producen precursores aminoacídicos desde piruvato y que proveen de NADPH necesario para procesos biosintéticos y antioxidantes (Doubnerová y Ryšlavá 2011). Adicionalmente, habría una inhibición sobre la vía glicolítica mediada por intermediarios de la vía de síntesis de trehalosa, la cual estaría activa durante desecación (Wingler 2002; Grennan 2007). Por lo tanto, la nula variación de actividad PDH registrada durante el periodo de estrés, se relacionaría con la inactivación de ciertos cofactores enzimáticos y disminución en el sustrato disponible. Por otro lado, durante el proceso de recuperación, los altos niveles de transcritos y actividad del gen *pdh* detectados serían congruentes con el hecho que durante este periodo se genera un aumento en la demanda energética debido a la biosíntesis de proteínas y moléculas complejas (López 2012). Luego, el gen *pdh* variaría su expresión durante el ciclo desecación y re-hidratación natural en base a la demanda celular de: energía, poder reductor y precursores biosintéticos.

Genes asociados al metabolismo antioxidante: *peroxirredoxina*, *tioredoxina* y *catalasa*

En esta tesis se demostró que los niveles de transcritos del gen *peroxirredoxina* (*prx*) aumentaron mayoritariamente durante la primera hora de desecación y durante re-hidratación. Por otra parte, los mRNA de los genes

tiorredoxina (trx) y *catalasa (cat)*, mostraron acumulación a mayor tiempo de exposición a desecación y durante la segunda hora de re-hidratación. El aumento de EROs documentado durante desecación, requiere un sistema eficiente de eliminación para la mantención de las funciones celulares. El producto del gen *prx* analizado en *P. columbina*, corresponde a una peroxirredoxina que se ubica potencialmente en el cloroplasto y que posee 2 residuos cisteína en el sitio activo, las cuales deben encontrarse en su forma reducida (-SH) para poder ser funcionales (Dietz y cols. 2002; Tripathi y cols. 2009). La mantención de la funcionalidad de estos residuos está dada por el sistema enzimático tiorredoxina-tiorredoxina reductasa (TRX-TRXR) (Baier y Dietz 1996, ver más abajo). Los niveles de transcritos del gen *prx* experimentaron un alza significativa durante la primera hora de desecación en *P. columbina*, sin embargo esta observación se revierte hacia la cuarta hora de estrés. Esta diferencia se puede explicar por el aumento de la hormona vegetal ABA registrada en *P. columbina* durante las últimas horas de desecación (Guajardo 2013). Por ejemplo, se ha observado que esta hormona reprime el gen asociado a peroxirredoxinas del tipo 2-Cys, el mismo tipo analizado en *P. columbina*, en un arbusto nativo de áreas secas llamado *Tamarix hispida* (Gao y cols. 2012), regulando positivamente la transcripción de genes asociados a otros tipos de *prx*. Contrario a los cambios en los niveles de mRNA, la máxima actividad PRX fue observada durante la cuarta hora de desecación, lo cual es

congruente con lo observado en estudios anteriores en *P. columbina* (Contreras-Porcía y cols. 2011).

Por otra parte, tanto los niveles de transcritos como la actividad del producto del gen *trx* aumentaron en la especie tolerante durante desecación, alcanzando un máximo durante la segunda hora de re-hidratación. Esta observación podría explicar parte de la actividad enzimática PRX detectada durante desecación 4 h, debido a que las TRX corresponden a uno de los agentes reductores de peroxirredoxina (Rouhier y Jacquot 2002; Schürmann y Buchanan 2008). Por lo tanto, se sugiere que en *P. columbina* bajo desecación, el sistema TRX-TRXR estaría entre otras funciones, regenerando peroxirredoxina a su forma reducida activa. En este contexto, la variación en los niveles de mRNA y actividad enzimática del producto del gen *trx*, responderían a la necesidad celular de mantener enzimas asociadas al metabolismo antioxidante en su forma reducida activa.

En *P. columbina*, se detectaron los niveles de mRNA del gen *cat*, homólogo al recientemente descrito en la macroalga roja *Porphyra yezoensis* (Li y cols. 2012). Los mayores niveles transcritos de *cat* en *P. columbina* se registraron durante desecación 4 h y re-hidratación 2 h observándose una regulación transcripcional de la enzima catalasa durante las últimas horas de desecación. Sin embargo, no hubo una relación entre los niveles de mRNA y la actividad catalasa registrada bajo dos horas de re-hidratación. Esto puede deberse a que por un lado no exista una relación directa entre niveles de mRNA

y el producto proteico, o adicionalmente, que una leve inhibición enzimática durante ese periodo permita mantener un nivel transiente de EROs – principalmente H_2O_2 – necesario para la inducción de ciertos mecanismos de señalización intracelular durante condiciones de estrés (Blokhina y Fagerstedt 2010). En este contexto, la regulación de los niveles de EROs durante el proceso de desecación y re-hidratación en *P. columbina*, sería necesaria para tolerar esta condición de estrés ambiental. Por lo tanto, la expresión diferencial del gen *cat* en *P. columbina* a lo largo del ciclo desecación y re-hidratación natural, respondería a la necesidad celular de mitigar las especies radicalarias producidas.

Finalmente, la coordinación entre la variación de los mRNAs y la actividad de los genes *prx*, *trx* y *cat* en *Pyropia columbina* serían cruciales en la tolerancia a desecación que demuestra esta especie. La activación de estos genes sería indispensable durante desecación y las primeras horas de re-hidratación. Sin embargo, la interacción entre ellos y el nivel de importancia individual se mantienen sin dilucidar.

Análisis funcional de los genes estudiados en las especies sensibles *Mazzaella laminarioides*, *Scytosiphon lomentaria* y *Lessonia spicata*.

Genes asociados a metabolismo basal

Las especies sensibles estudiadas mantuvieron la actividad enzimática trehalosa fosfato sintasa (TPS) y piruvato deshidrogenasa (PDH) en niveles relativamente constantes a lo largo del ciclo desecación y re-hidratación, lo cual

sugiere una inhibición enzimática. En algunas especies sensibles (i.e. *S. gracilis* y *L. spicata*) se ha reportado la presencia de altos niveles de lipoperóxidos como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) durante desecación y estrés por metales (Contreras-Porcía y cols. 2011, 2012; Lovazzano y cols. 2013). Registros en mitocondrias derivadas de corazones de ratas que han sido incubadas con HNE, evidencian que este producto tóxico es capaz de disminuir la actividad PDH hasta en un 46 % debido a que oxida el cofactor enzimático ácido lipóico (Humphries y Szweda 1998). En este contexto, si las especies sensibles no pueden atenuar los productos derivados de EROs generadas durante desecación, se observarían efectos inhibitorios sobre el metabolismo celular. Por otro lado, la baja actividad TPS detectada, permitiría explicar los daños morfo-funcionales observados en estas macroalgas durante desecación (Contreras-Porcía y cols. 2012) en comparación con *P. columbina*, donde no se evidencia ningún tipo de inhibición enzimática bajo este estrés, como tampoco alteraciones ultraestructurales (Contreras-Porcía y cols. 2011). Estas alteraciones a nivel de desintegración de membranas celulares también podrían explicar la baja actividad enzimática PDH registrada en las especies sensibles, debido a que esta enzima se encuentra asociada a las membranas mitocondrial y cloroplástica. Por lo tanto la inactivación de las enzimas de metabolismo basal indicaría que las especies sensibles i) son incapaces de sintetizar el azúcar estabilizador trehalosa y ii) la poca capacidad de disminuir la generación de EROs.

Genes asociados al metabolismo antioxidante

En este estudio se demuestra que todas las enzimas antioxidantes analizadas en las especies sensibles tuvieron una baja actividad y leve variación durante el ciclo desecación y re-hidratación *in vitro*. Por ejemplo, la actividad PRX aumentó levemente durante las horas de desecación en la especie *M. laminarioides*, pero no en *S. lomentaria* y *L. spicata*. Esto puede deberse a que i) la célula no posee energía suficiente para la activación de factores de tolerancia, o ii) que los efectos negativos generados por la condición de estrés durante desecación afectan la maquinaria celular a nivel transcripcional y/o traduccional. De hecho, se ha demostrado que la inactivación de genes de tolerancia en *Lessonia spicata* frente a estrés por metales ocurre principalmente a nivel transcripcional (Contreras 2005), a diferencia de su contraparte tolerante la cual activa diversos factores de tolerancia frente a estrés por cobre (Contreras 2005; Contreras y cols. 2005, 2009).

Con respecto a la enzima tiorredoxina, se evidenció inhibición de la actividad TRX durante todo el ciclo desecación y re-hidratación en la especie *M. laminarioides* y al final del periodo de re-hidratación en *L. spicata*. Esta inhibición, podría generarse por alteraciones directas de EROs sobre el sistema enzimático o por una activación ineficiente de la enzima tiorredoxina reductasa. La pérdida de funcionalidad TRX, explicaría la baja variación de la actividad PRX observada bajo desecación en estas especies. De hecho, algo similar ha sido observado recientemente en *L. spicata* frente a estrés por metales, en

donde la baja actividad peroxirredoxina registrada se relaciona con una nula actividad tioredoxina (Lovazzano y cols. 2013). En *S. lomentaria*, la actividad TRX aumentó durante las horas de desecación y disminuyó durante las últimas horas de re-hidratación, sin observarse un aumento similar en la actividad PRX de esta especie. Por lo tanto se infiere que por sí solo, el aumento de actividad TRX no sería suficiente para recuperar la actividad de ciertas enzimas, las cuales son esenciales en el proceso de atenuación de EROs sobre-producidas durante desecación.

Las diferencias más significativas entre las especies sensibles y *P. columbina* se registraron a nivel de la actividad CAT. Si bien en las tres especies se observó mayor actividad durante las horas de desecación, ésta fue menor que la observada en *P. columbina*. El aumento de actividad CAT registrada en las especies sensibles durante desecación, es congruente con lo observado en hojas y/o semillas de organismos como maravilla, maíz, tomate y poroto expuestos a estrés por desecación, en los cuales hubo una correlación negativa entre el contenido de agua intracelular y la actividad CAT (Bailly y cols. 2001, 2004; Hsieh y cols. 2002; Jiang y Zhang 2002). Adicionalmente, se ha propuesto que la transcripción del gen asociado a catalasa es regulada por la interacción de H₂O₂ y ácido abscísico (ABA) con elementos de respuesta antioxidante y elementos de respuesta a ABA, respectivamente (Polidoros y Scandalios 1999; Guan y cols. 2000). Bajo desecación, en las especies sensibles se sobre produce peróxido de hidrógeno (Flores-Molina y cols. datos

sin publicar) y ABA (Guajardo 2013). Por lo tanto, se sugiere que el alza de la actividad CAT bajo desecación en las especies sensibles, tendría relación con una regulación transcripcional mediada por estas moléculas. Los resultados de esta tesis mostraron que en las especies sensibles, la actividad catalasa se encuentra activa en menor grado que en *P. columbina*, por lo cual estas especies son capaces de atenuar en menor grado el H₂O₂ generado durante desecación.

Finalmente, las observaciones en relación a la actividad de las tres enzimas antioxidantes estudiadas (i.e. peroxirredoxina, tiorredoxina y catalasa) realizadas en las especies sensibles, permitirían explicar la insuficiente tolerancia que éstas presentan frente al estrés por desecación, razón por la cual ninguna de ellas se encuentra en la zona más alta del intermareal, lugar donde se genera una alta condición de estrés oxidativo. En el caso de *Mazzaella laminarioides*, posiblemente su cercanía en la zona intermareal con la especie tolerante, le permita adquirir productos solubles liberados por *P. columbina* que le confieran cierto grado de tolerancia. De hecho, en estadios microscópicos se ha observado que compuestos de *P. columbina* bajo desecación protegen a las especies sensibles del efecto negativo de esta condición de estrés (Contreras-Porcía y cols. 2012). Luego, este trabajo de tesis evidencia que las diferencias encontradas a nivel de la capacidad de atenuar la condición de estrés por desecación natural, particularmente a nivel del sistema antioxidante, regularían a nivel ecológico la distribución de las especies a nivel de la zona intermareal.

V. CONCLUSIONES

Todos los genes de tolerancia identificados en *Pyropia columbina* analizados en la presente memoria, mostraron una expresión diferencial durante el ciclo desecación y re-hidratación natural.

Durante desecación la especie podría i) generar un azúcar estabilizador de membranas y macromoléculas y ii) inhibir la producción y atenuar EROs.

Durante re-hidratación, *P. columbina* podría i) generar energía necesaria para recuperar funciones deprimidas durante desecación y ii) controlar las EROs derivadas de la re-activación de procesos metabólicos y fotosintéticos.

Todos los productos génicos estudiados mostraron actividad en las especies sensibles analizadas. Sin embargo, la activación enzimática fue menor que en la especie tolerante observándose incluso inactivación.

Ambos, la regulación e interacción entre las vías que le confieren tolerancia a desecación a *P. columbina*, son deficientes en las especies *M. laminarioides*, *S. lomentaria* y *L. spicata* por lo cual estas especies no pueden mitigar el daño estructural y oxidativo generado por la desecación (Figura 16).

La importancia del presente trabajo es que plantea a la inducción transcripcional en *Pyropia columbina*, como un factor que permite integrar las vías involucradas en la tolerancia a desecación y por otro lado evidenciar la ineficiencia de las especies sensibles en la utilización de los mecanismos mitigantes del estrés por desecación.

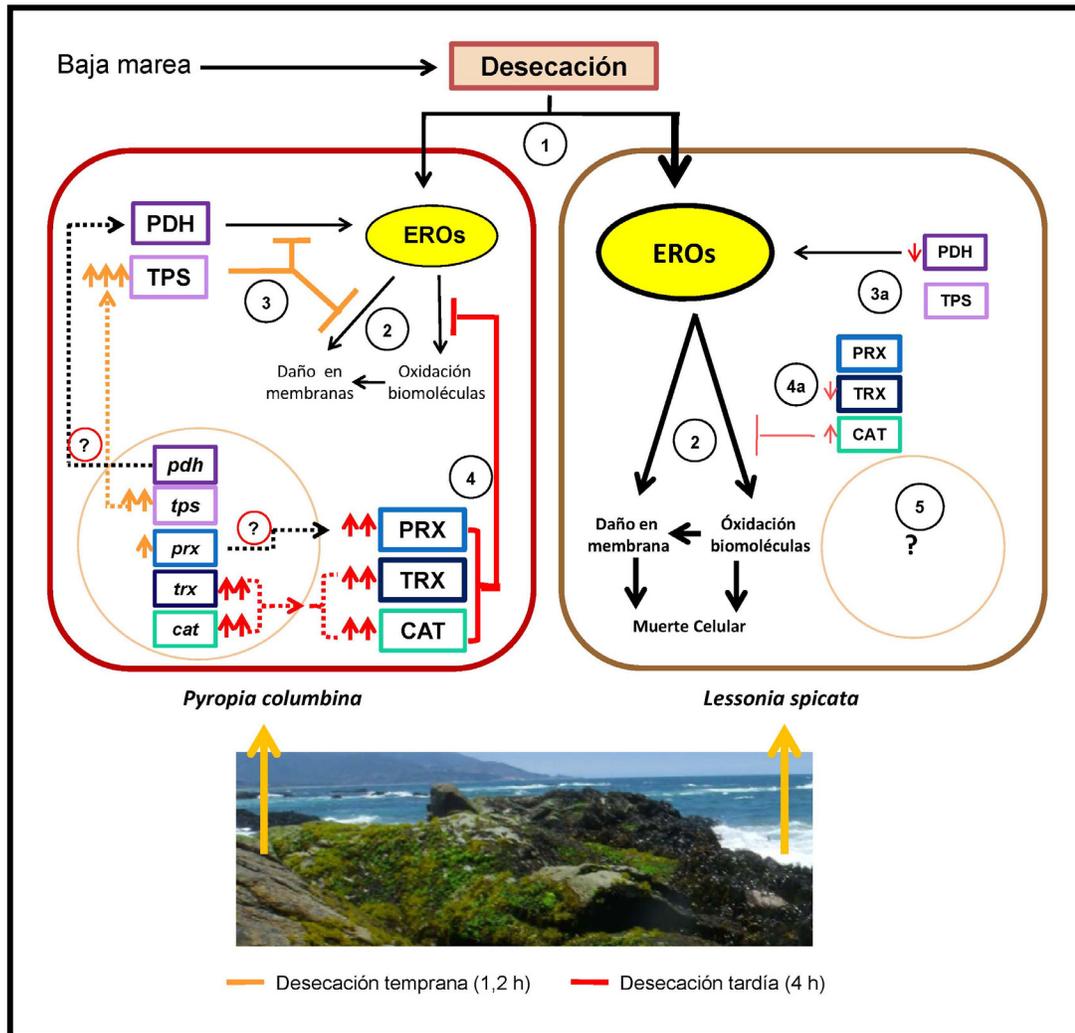


Figura 16. Mecanismos de tolerancia bajo desecación en organismos intermareales. Al bajar la marea se induce desecación sobre las macroalgas intermareales. Esta condición de estrés, provoca un aumento de EROs (1), el cual es mayor en la especie sensible *L. spicata*. Los efectos dañinos de las especies radicalarias producidas, incluyen la oxidación de moléculas y daños en estructuras de membrana (2), las cuales influyen en la viabilidad celular de la especie sensible. En esta memoria se estableció que la especie tolerante *P. columbina* modula la expresión de genes pertenecientes al metabolismo basal y antioxidante durante las horas de desecación. La temprana inducción transcripcional de la enzima TPS le permite al organismo tolerante estabilizar membranas y macromoléculas, disminuyendo adicionalmente las EROs provenientes del metabolismo basal (3). Mientras que la inducción transcripcional tardía de las enzimas antioxidantes le permite mitigar las EROs producidas (4). Contrariamente, la especie sensible no mostró una activación enzimática similar a la de *P. columbina* tanto para TPS (3a) como para TRX y PRX. Sin embargo, se registró un leve aumento de la enzima CAT (4a), el cual fue mucho menor al registrado en la especie tolerante, por lo cual no sería capaz de superar el estrés por desecación. Finalmente, aun falta dilucidar a nivel genético lo que sucede con las especies sensibles (5).

VI. REFERENCIAS

1. AEBI H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
2. ALPERT P. 2000. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology*. 151: 5-17.
3. ALPERT P. 2006. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare?. *The Journal of Experimental Biology*. 209: 1575-1584.
4. ARNÉR E. y HOLMGREN A. 2000. Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Current Protocols in Toxicology*. 24: 7.4.1-7.4.14.
5. BAIER M. y DIETZ K.J. 1996. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Molecular Biology*. 31: 553-564.
6. BAILLY C., AUDIGIER C., LADONNE F., WAGNER M.H., COSTE F., CORBINEAU F. y CÔME D. 2001. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany*. 52(357): 701-708.
7. BAILLY C., LEYMARIE J., LEHNER A., ROUSSEAU S., COME D. y CORBINEAU F. 2004. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of Experimental Botany*. 55(396): 475-483.
8. BAKER C.J. y ORLANDI E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*. 33: 299-321.
9. BARTELS D. y SALAMINI F. 2001. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology*. 127: 1346-1353.
10. BLOKHINA O. y FAGERSTEDT K.V. 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 359-373.
11. BOHNERT H.J. 2000. What makes desiccation tolerable?. *Genome Biology*. 1(2): reviews1010.1-1010.4
12. BURRIT D.J., LARKINDALE J., y HURD C.L. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta*. 215: 829-838.
13. CABIB E. y LELOIR L.F. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. 231(1): 259-75
14. CAMUS C., MEYNARD A.P., FAUGERON S., KOGAME K. y CORREA J.A. 2005. Differential life history phase expression in two coexisting species of *Scytosiphon* (Phaeophyceae) in northern Chile. *Journal of Phycology*. 41: 931-941.
15. CONTRERAS L. 2005. Respuestas bioquímicas y moleculares en *Scytosiphon lomentaria* y *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) al estrés oxidativo generado por cobre. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas, mención Genética Molecular y Microbiología. Santiago. Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. 236p.

16. CONTRERAS L., MOENNE A. y CORREA J.A. 2005. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *Journal of Phycology*. 41: 1184-1195.
17. CONTRERAS L., MELLA D., MOENNE A. y CORREA J.A. 2009. Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology*. 94: 94-102.
18. CONTRERAS-PORCIA L., THOMAS D., FLORES V. y CORREA J.A. 2011. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Experimental Botany*. 62(6): 1815-1829.
19. CONTRERAS-PORCIA L., CALLEJAS S., THOMAS D., SORDET C., POHNERT G., CONTRERAS A., LAFUENTE A., FLORES-MOLINA M.R. y CORREA J.A. 2012. Seaweeds early development: detrimental effects of desiccation and attenuation by algal extracts. *Planta*. 235: 337-348.
20. CONTRERAS-PORCIA L., LÓPEZ-CRISTOFFANINI C., LOVAZZANO C., FLORES-MOLINA M.R., THOMAS D., NUÑEZ A., FIERRO C., GUAJARDO E., CORREA J.A., KUBE M. y REINHARDT R. [s.a]. Differential gene expression in *Pyropia columbina* (Bangiales, Rhodophyta) under natural hydration and desiccation stress. *Lajar*. Aceptado
21. DE BOER M.E., DE BOER T.E., MARIËN J., TIMMERMANS M.J.T.N., NOTA B., VAN STRAALEN N.M., ELLERS J. y ROELOFS D. 2009. Reference genes for QRT-PCR tested under various stress conditions in *Folsomia candida* and *Orchesella cincta* (Insecta, Collembola). *BMC Molecular Biology*. 10: 54.
22. DIETZ K.J., HORLING F., KÖNING J. y BAIER M. 2002. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *Journal of Experimental Botany*. 53(372): 1321-1329.
23. DINAKAR C. y BARTELS D. 2012. Light response, oxidative stress management and nucleic acid stability in closely related Linderniaceae species differing in desiccation tolerance. *Planta*. 236(2): 541-55.
24. DOUBNEROVÁ V. y RYŠLAVÁ H. 2011. What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress?. *Plant Science*. 180: 575-583.
25. EL-BASHITI T., HAMAMCI H., ÖKTEM H.A. y YÜCEL M. 2005. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science*. 169: 47-54.
26. FARRANT J.M. 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*. 151: 29-39.
27. FLORES-MOLINA M.R., THOMAS D., LOVAZZANO C., NUÑEZ A., ZAPATA J., KUMAR M., CORREA J.A y CONTRERAS-PORCIA L. [s.a]. Desiccation stress in intertidal seaweeds: effects on morphology, photosynthetic performance and antioxidant responses. *Aquatic Botany*. Aceptado
28. FOYER C.H. y NOCTOR G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidant y Redox Signaling*. 11(4): 861-905
29. FRANÇA M.B., PANEK A.D y ELEUTHERIO E.C.A. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A 146: 621-631.
30. GAO C., ZHANG K., YANG G. y WANG Y. 2012. Expression analysis of four peroxiredoxin genes from *Tamarix hispida* in response to different abiotic

- stresses and exogenous abscisic acid (ABA). *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 3751-3764.
31. GECHEV T.S., BENINA M., OBATA T., TOHGE T., SUJEETH N., MINKOV I., HILLE J., TEMANNI M.R., MARRIOTT A.S., BERGSTRÖM E., THOMAS-OATES J., ANTONIO C., MUELLER-ROEBER B., SCHIPPERS J.H.M., FERNIE A.R. y TONEVA V. 2013. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection glacial relic *Haberlea rhodopensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70: 689-709.
 32. GODDIJN O.J.M. y VAN DUN K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science*. 4(8): 315-319.
 33. GONZÁLEZ A., BELTRÁN J., HIRIART-BERTRAND L., FLORES V., DE REVIERS B., CORREA J.A y SANTECILES B. 2012. Identification of cryptic species in the *Lessonia nigrescens* complex (Phaeophyceae, Laminariales). *Journal of Phycology*. 48: 1153-1165.
 34. GRENNAN A.K. 2007. The role of trehalose biosynthesis in plants. *Plant Physiology*. 144: 3-5.
 35. GUAJARDO E. 2013. Rol del ácido Abscísico en las respuestas de tolerancia a estrés por desecación en macroalgas. Tesis de Magister en Biología Marina. Santiago. Universidad Andrés Bello. Facultad de Ecología y Recursos Naturales. 81p.
 36. GUAN L.M., ZHAO J. y SCANDALIOS J.G. 2000. *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress. H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal*. 22(2): 87-95.
 37. GUO P., BAUM M., GRANDO S., CECCARELLI S., BAI G., LI R., VON KORFF M., VARSHNEY R.K., GRANER A. y VALKOUN J. 2009. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany*. 60(12): 3531-3544.
 38. GUO R. y KI J.S. 2012. Evaluation and validation of internal control genes for studying gene expression in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* using real-time PCR. *European Journal of Protistology*. 48(3): 199-206.
 39. HARLEY C.D.G., HUGHES A.R., HULTGREN K.M., MINER B.G., SORTE C.J.B., THORNER C.S., RODRIGUEZ L.F., TOMANEK L. y WILLIAMS S.L. 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*. 9: 228-241.
 40. HELMUTH B. 2002. How do we measure the environment? Linking intertidal thermal physiology and ecology through biophysics. *Integrative and Comparative Biology*. 42:837-845.
 41. HOFFMANN A. y SANTELICES B. 1997. Flora Marina de Chile Central. 1º Ed. Santiago de Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile. 434 p.
 42. HSIEH T.H., LEE J.T., CHARNG Y.Y. y CHAN M.T. 2002. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology*. 130: 618-626.
 43. HUMPHRIES K.M. y SZWEDA L.I. 1998. Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*. 37: 15835-15841.

44. JIANG M. y ZHANG J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 53(379): 2401-2410.
45. KLEINES M., ELSTER R.C., RODRIGO M.J., BLERVACQ A.S., SALAMINI F. y BARTELS D. 1999. Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta*. 209: 13-24.
46. LE BAIL A., DITTAMI S.M., DE FRANCO P.O., ROUSVOAL S., COCK M.J., TONON T. y CHARRIER B. 2008. Normalization genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*. *BMC Molecular Biology*. 9: 75.
47. LEPRINCE O. y BUITINK J. 2010. Desiccation tolerance: from genomics to the field. *Plant Science*. 179: 554–564
48. LEHNINGER, NELSON D.L. y COX M.M. 2006. Principios de Bioquímica. 4ª Ed. España. Omega. 1176p.
49. LI X.C., XING Y.Z., JIANG X., QIAO J., TAN H.L., TIAN Y. y ZHOU B. 2012. Characterization of the catalase gene *PyCAT* from the red alga *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 48: 664-669.
50. LÓPEZ C. 2012. Identificación de proteínas involucradas en los mecanismos de tolerancia al estrés por desecación en *Porphyra columbina* (Rhodophyta, Bangiales). Tesis de Bioquímico. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. 70p
51. LÓPEZ-CRISTOFFANINI C., TELLIER F., OTAÍZA R., CORREA J.A. y CONTRERAS-PORCIA L. [s.a]. Differential tolerance to desiccation: a factor driving the latitudinal distribution of two sibling kelp species. *Botanica Marina*. Aceptado.
52. LOVAZZANO C., SERRANO C., CORREA J.A. y CONTRERAS-PORCIA L. 2013. Comparative analysis of peroxiredoxin activation in the brown macroalgae *Scytosiphon gracilis* and *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) under copper stress. *Physiologia Plantarum*. Doi. 10.1111/ppl.12047
53. MONTECINOS A., BROITMAN B.R., FAUGERON S., HAYE P.A., TELLIER F. y GUILLEMIN M.L. 2012. Species replacement along a linear coastal habitat: phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the south east pacific. *BMC Evolutionary Biology*. 12:97
54. MOORE J.P., LE N.T., BRANDT W.F., DRIOUICH A. y FARRANT J.M. 2009. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*. 14 (2): 110-117.
55. MÜLLER J., SPRENGER N., BORTLIK K., BOLLER T. y WIEMKEN A. 1997. Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the Gesneriaceae. *Physiologia plantarum*. 100: 153-158.
56. PANDEY V., RANJAN S., DEEBA F., PANDEY A.K., SINGH R., SHIRKE P.A. y PATHRE U.V. 2010. Desiccation-induced physiological and biochemical changes in resurrection plant, *Selaginella bryopteris*. *Journal of Plant Physiology*. 167: 1351-1359.
57. PFAFFL M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9): 2002-2007.

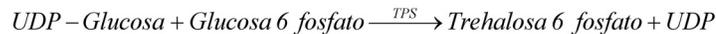
58. POLIDOROS A.N y SCANDALIOS J.G. 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*. 106: 112-120.
59. RAPALA-KOZIK M., KOWAJSKA E. y OSTROWSKA K. 2008. Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 59(15): 4133-4143.
60. ROUHIER N. y JACQUOT J.P. 2002. Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynthesis Research*. 74: 259-268.
61. SAMPATH-WILEY P., NEEFUS C.D. y JAHNKE L.S. 2008. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützing (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 361: 83-91
62. SCHWIMMER S. y WESTON W.J. 1961. Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. *Agricultural and food chemistry*. 9 (4) 301-304.
63. SCHÜRMAN P. Y BUCHANAN B.B. 2008. The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants y Redox Signaling*. 10(7): 1235-1274.
64. STOLF-MOREIRA R., LEMOS E.G.M., CARARETO-ALVES L., MARCONDES J., PEREIRA S.S., ROLLA A.A.P., PEREIRA R.M., NEUMAIER N., BINNECK E., ABDELNOOR R.V., DE OLIVEIRA M.C.N., MARCELINO F.C., FARIAS J.R.B. y NEPOMUCENO A.L. 2011. Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress. *Plant Molecular Biology Reporter*. 29: 19-34.
65. SUTHERLAND J.E., LINDSTROM S.C., NELSON W.A., BRODIE J., LYNCH M.D.J., HWANG M.S., CHOI H.G., MIYATA M., KIKUCHI N., OLIVEIRA M.C., FARR T., NEEFUS C., MOLS-MORTENSEN A., MILSTEIN D. y MÜLLER K.M.2011. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 47: 1131-1151.
66. SZUTOWICZ A., STEPIEN M. y PIEC G. 1981. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coa synthetase activities using citrate synthase. *Analytical Biochemistry*. 115: 81-87.
67. THEVELEIN J.M. y HOHMANN S. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?. *Trends in Biochemical Sciences*. 20(1): 3-10.
68. TOLDI O., TUBA Z. y SCOTT P. 2009. Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops?. *Plant Science*. 176: 187-199.
69. TOMANEK L. y HELMUTH B. 2002. Physiological ecology of rocky intertidal organisms: a synergy of concepts. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 771-775.
70. TRIPATHI B.N., BHATT I. y DIETZ K.J. 2009. Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma*. 235:3-15.
71. VICRÉ M., LEROUXEL O., FARRANT J., LEROUGE P. y DRIOUICH A. 2004. Composition and desiccation-induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*. *Physiologia Plantarum*. 120: 229-239.
72. WALKER J. 2002. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. En: The Protein Protocols Handbook. 2ª Ed. EEUU. Humana Press. pp. 11-14.

73. WHITTAKER A., MARTINELLI T., FARRANT J.M., BOCHICCHIO A. y VAZZANA C. 2007. Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in desiccation-tolerant leaf material of the C4 resurrection plant *Sporobolus stapfianus* during dehydration. *Journal of Experimental Botany*. 58(13): 9775-9787.
74. WINGLER A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*. 60: 437-440.
75. YOKOYA N.S., STIRK W.A., VAN STADEN J., NOVÁK O., TUREČKOVÁ V., PĚNČÍK A. y STRNAD M. 2010. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in red algae from brazil. *Journal of Phycology*. 46: 1198-1250.
76. ZOU D. y GAO K. 2002. Effects of desiccation and CO2 concentrations on emersed photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China. *European Journal of Phycology*. 37(4): 587-592.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Esquemas de reacciones utilizadas en los ensayos enzimáticos

A. Reacción trehalosa fosfato sintasa



B. Reacción piruvato kinasa



C. Formación compuesto coloreado



Esquema 1. Ensayo de actividad trehalosa fosfato sintasa (TPS). Se observa la ecuación química de la formación del compuesto dinitrofenilhidrazona de piruvato. A mayor actividad TPS, mayor es la presencia de este compuesto. Uridina difosfato (UDP), Fosfoenolpiruvato (PEP), Uridina trifosfato (UTP), 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNFH).

A. Reacción piruvato deshidrogenasa



B. Reacción citrato sintasa

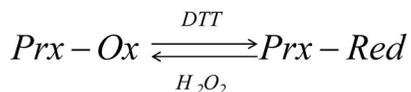


C. Reducción DTNB

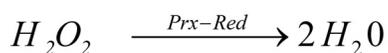


Esquema 2. Ensayo de actividad piruvato deshidrogenasa (PDH). Se determinó la formación del anión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) que tiene una máxima absorbancia a 412 nm. Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado/reducido ($NAD^+/NADH$), Coenzima A (CoASH), Tiamina pirofosfato (TPP), Flavin adenin dinucleótido (FAD), Dióxido de carbono (CO_2), Ácido Oxalacético (OAA), 5'-ditiobis-(2- ácido nitrobenzoico) (DTNB), 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) y Derivado de TNB (CoASSTNB).

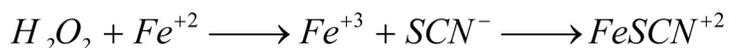
A. Reducción de peroxirredoxinas mediante DTT



B. Reacción catalizada por peroxirredoxina



C. Formación complejo ferrotiocianato

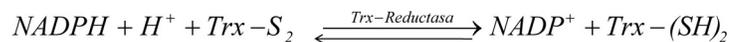


Esquema 3. Ensayo de actividad peroxirredoxina (PRX). Se observa la ecuación química de la formación del complejo ferrotiocianato. A mayor actividad PRX, menor es la presencia de este complejo. Peroxirredoxina oxidada/reducida (Prx-Ox/ Prx-Red), Ditiotreitól (DTT), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Hierro ($\text{Fe}^{+2/+3}$), Tiocianato (SCN^-), Complejo ferrotiocianato (FeSCN^{+2}).

A. Reacción catalizada por tiorredoxina



B. Reacción catalizada por tiorredoxina reductasa



C. Reducción DTNB



Esquema 4. Ensayo de actividad tiorredoxina (TRX). Se monitoreó la presencia de TNB con una absorbancia máxima a 412 nm. Tiorredoxina reducida/oxidada ($\text{Trx} - (\text{SH})_2/\text{Trx} - \text{S}_2$), Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido/oxidado ($\text{NADPH}/\text{NADP}^+$), 5'-ditiobis-(2- ácido nitrobenzoico) (DTNB), 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB).

A. Reacción catalizada por catalasa



Esquema 5. Ensayo de actividad catalasa (CAT). Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Anexo 2. Condiciones de ensayo para las reacciones enzimáticas

I. Trehalosa fosfato sintasa

Para determinar la concentración de sustrato y tiempo adecuados para llevar a cabo la reacción trehalosa fosfato sintasa de acuerdo al Esquema 1, se determinó la concentración de piruvato formado utilizando un rango del sustrato glucosa 6 fosfato 0-20 mM (Figura 17 A). Adicionalmente, se determinó la absorbancia a los 5, 15 y 25 minutos de reacción. En base a estos resultados, se ensayó la actividad TPS utilizando glucosa 6 fosfato 10 mM y 15 min de reacción.

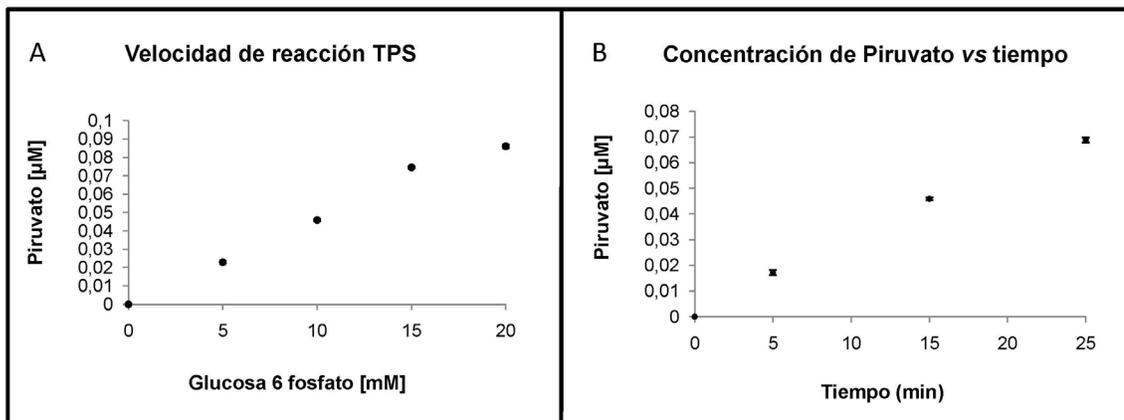


Figura 17. Velocidad de reacción TPS bajo distintas concentraciones de sustrato (A) y tiempo (B). El gráfico (B) se realizó utilizando glucosa 6 fosfato 10 mM.

Para cuantificar el piruvato formado en el ensayo TPS, se construyó una curva estándar con ácido pirúvico 1-20 nM, la cual se muestra en la Figura 18. La curva fue lineal en el rango ensayado, por lo cual es adecuada para la cuantificación propuesta.

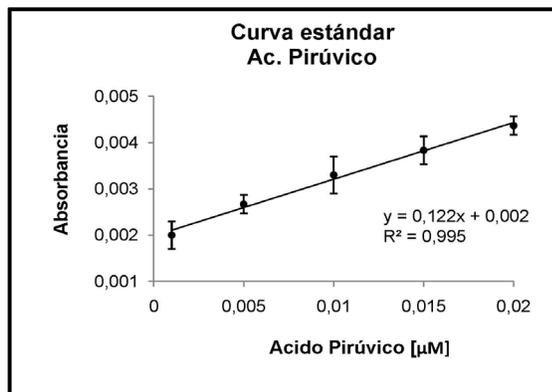


Figura 18. Curva estándar para ácido pirúvico. Se determinó la absorbancia de un rango de ácido pirúvico 1-20 nM.

II. Piruvato deshidrogenasa

La determinación de las condiciones de ensayo para la enzima piruvato deshidrogenasa se realizó midiendo la concentración de TNB bajo un rango de concentraciones de coenzima A 0-0,3 mM (Figura 19 A). Adicionalmente, para cada concentración utilizada se determinó el tiempo óptimo de detección (Figura 19 B).

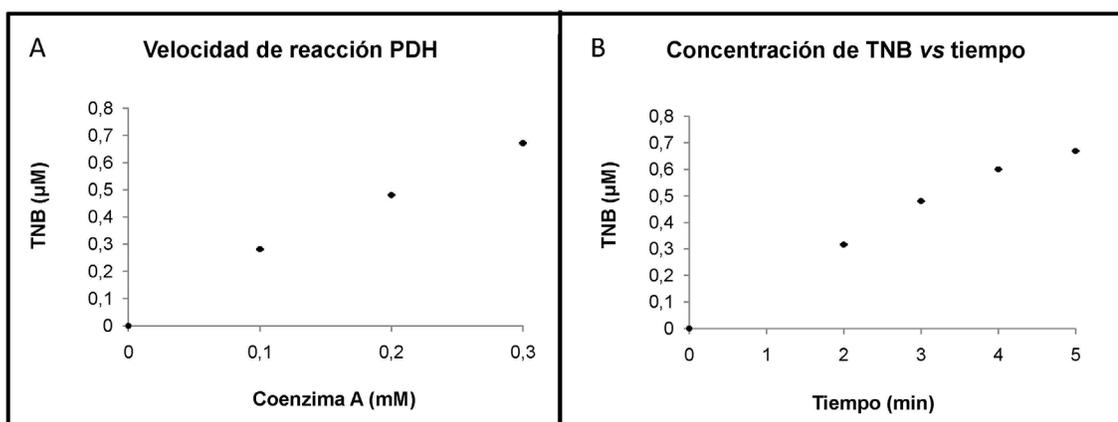


Figura 19. Velocidad de reacción PDH bajo distintas concentraciones de sustrato (A) y tiempo (B). El gráfico (B) se realizó utilizando Coenzima A 0,2 mM.

A partir de estas determinaciones se ensayó la actividad piruvato deshidrogenasa utilizando Coenzima A 0,2 mM y monitoreando la formación de producto durante 3 min.

III. Tiorredoxina

Las condiciones de ensayo adecuadas para tiorredoxina se determinaron evaluando la aparición de TNB al utilizar para la reacción un rango de insulina 0-0,6 mM (Figura 20 A), durante 10, 20, 30 y 35 minutos (Figura 20 B). En base a estas determinaciones, el ensayo TRX se realizó con una concentración de insulina 0,3 mM y durante 20 minutos.

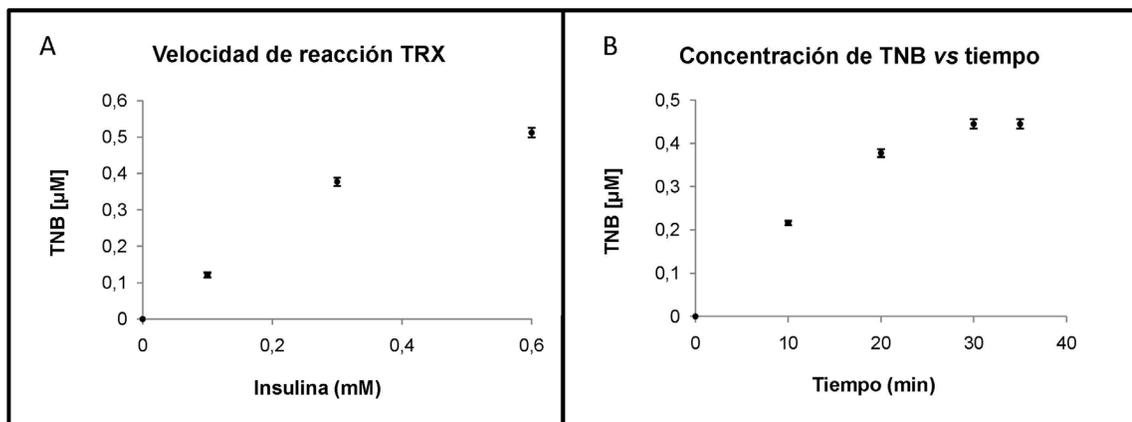


Figura 20. Velocidad de reacción TRX bajo distintas concentraciones de sustrato (A) y tiempo (B). El gráfico (B) se realizó utilizando insulina 0,3 mM.