



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magister en Bioquímica y Bioinformática

**Estudio Transcriptómico Comparativo de Proteínas
Estructurales de Ficobilisomas durante la Aclimatación
Fotoperiódica en *Gracilaria chilensis*.**

María Alejandra Vorphal Vásquez
CONCEPCIÓN-CHILE
2020

Profesor Guía: Dr. José Antonio Martínez Oyanedel
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. José Martínez Oyanedel
Profesor Guía
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Camilo Werlinger Ibañez
Profesor Co-Guía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción



Dra. Elena Amparo Uribe Pérez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dra. Estefanía Tarifeño Saldivia
Directora (s)
Programa de Magister en Bioquímica y
Bioinformática
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dedicatoria



A mi familia, especialmente a Domingo por ser la chispa de todo y a Alejandro, con quien podemos construirlo todo.

Agradecimientos

Al proyecto FONDECYT No. 113.0256, No. 108.0165, CR_LBFM; al laboratorio LBFM por su respaldo formativo desde siempre, a la Dra. Marta Bunster por su motivación, paciencia y apoyo; al Dr. José Martínez por su energía, apoyo y respaldo a pesar de todo; la Dra Carola Bruna por su rigurosa guía y a mis compañeros de laboratorio, con quienes crecimos en el trabajo científico haciendo de éste una experiencia provechosa y entretenida.



Indice

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiv
1 Introducción	1
1.1 Algas rojas y ficobilisomas	1
1.2 Fotosíntesis en rodófitas.....	8
1.3 Aclimatación en respuesta a cambios de luz.....	11
2 Hipótesis de trabajo.....	16
3 Objetivo General.....	17
4 Objetivos Específicos.....	17
5 Materiales.....	18
5.1 Enzimas modificadoras del DNA.....	18
5.2 Reactivos y soluciones.....	18
5.3 Medios de cultivo.....	19
5.4 Oligonucleótidos y fragmentos de DNA.....	20
6 Métodos.....	22
6.1 Cultivo de <i>Gracilaria chilensis</i>	22
6.2 Medición de fluorescencia de clorofila	23
6.3 Extracción de RNA total mediante columna de sílice.....	23
6.4 Digestión con DNasa.....	24
6.5 Secuenciación.....	25
6.6 Ensamblaje <i>de novo</i> y anotación	25
6.7 Transcripción reversa.....	26

6.8	PCR en tiempo real.....	26
6.9	Electroforesis de RNA en gel de agarosa y fotodocumentación.	27
6.10	Análisis de la estabilidad en la expresión de genes de referencia.	28
7	Resultados	30
7.1	Objetivo específico 1	30
7.1.1	Cultivo y aclimatación	30
7.2	Objetivo específico 2.....	33
7.2.1	Secuenciación, ensamblaje y anotación de transcriptoma de <i>Gracilaria chilensis</i> 33	
7.3	Objetivo específico 3.....	38
7.3.1	Determinación de la estabilidad en la expresión de genes candidatos a genes de referencia en muestras de <i>Gracilaria chilensis</i> aclimatadas a diferentes fotoperíodos.	38
7.3.2	Cuantificación relativa de la expresión de los genes que codifican para las proteínas Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF y ApcC en muestras de <i>Gracilaria chilensis</i> aclimatadas a diferentes fotoperíodos.....	51
8	Discusión.....	54
9	Conclusiones	72
10	Perspectivas.....	72
11	Bibliografía	73
12	Apéndices.....	83
12.1	Mezcla y Programa de Amplificación por qPCR para el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix (Agilent).....	83
12.1.1	Tabla de reacción para la amplificación.....	83
12.1.2	Programa de amplificación	83
12.2	Curvas de fotosíntesis versus irradiancia en respuesta a la aclimatación a los diferentes fotoperiodos.....	84
12.3	Análisis de los RNA totales extraído desde las muestras seleccionadas para secuenciación masiva de RNA (RNA-seq).....	85
12.4	Secuencias nucleotídicas seleccionadas para análisis comparativo mediante qRT-PCR.....	86

Tabla 1: Listado de proteínas <i>linker</i> descritas en algas rojas y cianobacterias.	7
Tabla 2: Resumen de datos obtenidos desde la secuenciación de la librería de <i>Gracilaria chilensis</i>	34
Tabla 3: Predicción de proteínas mediante homología de secuencia de los Contigs desde <i>Gracilaria chilensis</i>	37
Tabla 4: Parámetros de amplificación mediante RT-qPCR de los pares de partidores contra los candidatos a genes de referencia y los genes de interés en <i>Gracilaria chilensis</i>	41
Figura 1: Esquema general de los complejos de antena en algas.....	4
Figura 2: Esquema de la estrategia muestral para la obtención de los individuos de <i>Gracilaria chilensis</i> y de su cultivo <i>in vitro</i> para la extracción del RNA total usado en el ensayo de RNA-seq.	31
Figura 3: Análisis de la eficiencia fotosintética en las muestras de <i>Gracilaria chilensis</i> aclimatadas a diferentes fotoperiodos.	32
Figura 4: Gráfico de distribución de los Contigs consenso anotados según clasificaciones ontológicas sobre el RNA-seq de <i>Gracilaria chilensis</i>	35
Figura 5: Análisis del número de BLAST positivos con mejor puntaje (BLAST-hits) al comparar las secuencias de los Contigs contra los genes de distintas especies de algas, plantas y cianobacterias.....	36
Figura 6: Valores del ciclo de amplificación umbral (C_t) para 11 genes candidatos a genes de referencia en las condiciones de aclimatación a los tres fotoperiodos analizados en <i>Gracilaria chilensis</i>	39
Figura 7: Valores de amplificación mediante RT-qPCR de los candidatos a genes de referencia sobre todas las muestras de los diferentes grupos de aclimatación a los fotoperiodos en <i>Gracilaria chilensis</i>	42
Figura 8: Gráfico de la frecuencia acumulada porcentual (%) del error de normalización para un único gen de referencia (E) en <i>Gracilaria chilensis</i>	43
Figura 9: Gráficos de dispersión comparando los valores de expresión obtenidos para cada par de candidatos a genes de referencia para muestras de <i>Gracilaria chilensis</i> aclimatadas a diferentes fotoperiodos.	46
Figura 10: Análisis de la estabilidad de expresión para los candidatos a genes de referencia en muestras de <i>Gracilaria chilensis</i> aclimatadas a diferentes fotoperiodos.	47
Figura 11: Gráficos de Bland-Altman comparando los valores de expresión obtenidos para cada par de candidatos a genes de referencia para muestras de <i>Gracilaria chilensis</i> aclimatadas a diferentes fotoperiodos.	48
Figura 12: Gráficos de dispersión comparando los factores de normalización (NF) obtenidos para cada set de candidatos a genes de referencia para muestras de <i>Gracilaria chilensis</i> aclimatadas a diferentes fotoperiodos.	50

Figura 13: Expresión relativa normalizada de los ARNm de los genes *Linker* γ^{31} , *Linker* γ^{33} , *ApcF* y *ApcC* en las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperíodos.52

Figura 14: Modelo de organización de los ficobilisomas de *Gracilaria chilensis* en respuesta a los fotoperíodos de invierno y verano.71

Abreviaturas

α:	Eficiencia cuántica.
3-PGA:	Ácido 3-fosfoglicerol.
ACTA1:	Actina alfa 1.
APC:	Aloficocianina.
ApcF:	<i>Linker</i> Centro Aloficocianina F.
ApcC:	<i>Linker</i> Centro Aloficocianina C.
APS:	Persulfato de amonio.
ATP:	Adenosín trifosfato.
A₂₃₀:	Absorbancia a 230 nm.
A₂₆₀:	Absorbancia a 260 nm.
A₂₈₀:	Absorbancia a 280 nm.
CCA:	Adaptación Cromática Complementaria.
cDNA:	Copia de Ácido desoxiribonucleico.
Chl:	Clorofila.
CpcD:	<i>Linker</i> de Varilla Ficocianina.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DNA:	Ácido desoxiribonucleico.
dNTP:	Desoxirribonucleótidos trifosfatos.
DTT:	Ditiotreitól.

EDTA:	Acido etilen-diamino-tetracético.
μE:	micro Einstein. Unidad de medida correspondiente a la energía contenida en un micromol de fotones.
EF1:	Factor de elongación alfa.
Ek:	Índice de saturación de luz.
eRF:	Factor de terminación.
EtBr:	Bromuro de Etidio
ETR:	Tasa de Transporte de Electrones.
Fm:	Fluorescencia máxima.
F₀:	Fluorescencia inicial.
FRET:	Transferencia de energía de resonancia de Förster.
Fv:	Fluorescencia variable.
GAPDH:	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
GOI:	Gen de interés.
γ^{31}:	<i>Linker gamma</i> de 31 KDa.
γ^{33}:	<i>Linker gamma</i> de 33 KDa.
g:	Gramo.
IDT:	Integrated DNA Technologies.
IF4:	Factor de Iniciación.
KDa:	Kilo Dalton.
L_c:	<i>Linker Core</i> .
LHC:	Complejo Recolector de Luz (<i>Light Harvest Complex</i>).
LR:	<i>Linker</i> de Varilla (<i>Linker Rod</i>).
LRC:	<i>Linker Varilla-Core</i> (<i>Linker Rod-Core</i>).

LCM:	Linker <i>Core</i> -Membrana.
M:	Molar.
mg:	Milígramos.
min:	Minuto(s).
ml:	Mililitros.
mM:	Milimolar.
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero.
ms:	Milisegundos.
ng:	Nanogramos.
nm:	Nanómetros.
mmol:	Nanomol.
nM:	Nanomolar.
°C:	Grados celcius.
% (p/v):	Porcentaje peso en volumen.
% (v/v):	Porcentaje volumen en volumen.
OD:	Densidad óptica
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PAM:	Modulación por Amplitud de Pulso (<i>Pulse-Amplitude Modulation</i>)
PAR:	Radiación Fotosintéticamente Activa (400 a 700 nm).
PBS:	Ficobilisoma.
PC:	Ficocianina.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PE:	Ficoeritrina.
PEC:	Ficoeritrocianina.



PSI:	Fotosistema I.
PSII:	Fotosistema II.
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
RIN:	Número de Integridad del RNA.
RNA:	Ácido ribonucleico.
RNaseq:	Secuenciación masiva de RNA.
RT:	Transcriptasa reversa.
RPM:	Revoluciones por minuto.
s:	Segundo(s)
TAE:	Tampón Tris Acetato.
TE:	Tampón Tris-HCl-EDTA.
Tris:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; Tris-(hidroximetil)-aminometano
TUBA:	Tubulina alfa.
TUBB:	Tubulina beta.
U:	Unidad.
µg:	Microgramo.
µl:	Microlitros.
µM:	Micromolar.
×g:	Veces de fuerza centrífuga.
UBCE:	Ubiquitina E
UV-A:	Luz Ultra Violeta de rango de longitud de onda 315-400 nm.
UV-B:	Luz Ultra Violeta de rango de longitud de onda 200-315 nm.
UBQ:	Ubiquitina.

Resumen

La variación de la radiación solar a través de la columna de agua determina la sobrevivencia de las algas rojas y cianobacterias, por lo que han desarrollado respuestas metabólicas dinámicas en paralelo a la optimización de la captación de luz por parte de los complejos antena denominados ficobilisomas (PBS). Esta aclimatación fotoperiódica involucra una serie de mecanismos que operan a distintos tiempos, incluyendo entre ellos la adaptación cromática complementaria (CCA), observada en cianobacterias. Estudios previos de nuestro grupo de investigación sugieren que distintas condiciones de luz podrían provocar una reorganización de los PBS de la macroalga roja *Gracilaria chilensis* (pelillo), aunque no permiten concluir que sea comparable con CCA sino más bien con algún otro mecanismo de fotoaclimatación que prevenga el daño causado por condiciones saturantes de luz. Nuestro laboratorio se ha propuesto estudiar si los cambios de las condiciones de luz podrían provocar como respuesta un cambio en la organización general de los PBS, particularmente de las proteínas *linker* que estabilizan su estructura.

Decidimos estandarizar un modelo de cultivo *in vitro* de *Gracilaria chilensis* para estudiar los cambios transcripcionales de los genes que codifican las proteínas *linker* en respuesta a cambios en el fotoperiodo, simulando las horas de luz y oscuridad correspondientes a invierno (8/16) y verano (16/8). Usamos como indicador de la fotoaclimatación de nuestros cultivos a los fotoperiodos en estudio la eficiencia fotosintética, la que fue similar en ambas condiciones al día 16 del cultivo. Los cambios en los niveles de expresión de los genes de interés fueron evaluados mediante la técnica de RT-qPCR. Para el diseño de los partidores, obtuvimos un transcriptoma empleando

muestras de *G. chilensis* cultivadas en un fotoperiodo control (12/12), el cual mostró altas similitudes con los transcriptomas de otras algas rojas.

Para realizar el análisis de los niveles de expresión relativa mediante RT-qPCR, establecimos que la mejor normalización se obtuvo al emplear la media geométrica de los genes de referencia TUBB2 y eRF3. Estudiamos la expresión de 4 genes que codifican para cuatro proteínas estructurales: Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF y ApcC. A excepción del Linker γ^{33} , que mostró altos niveles de expresión en ambos fotoperiodos en estudio, sólo se observó un aumento de la expresión de los restantes genes en la condición de invierno. El mayor aumento se observó para el gen ApcC, seguido de los genes Linker γ^{33} , ApcF y Linker γ^{31} .

En base a la interpretación de nuestros resultados, tanto en los estudios funcionales previamente descritos (en algas rojas y cianobacterias) así como en la estructura del PBS de la macroalga roja *Griffithsia pacifica*, proponemos un modelo en el que el aumento en la expresión de estas proteínas *linker* en invierno favorecería la captación de luz y su conducción hasta el fotosistema II, producto de la formación de PBS altamente densos en varillas en *Gracilaria chilensis*.

Abstract

The changes of solar radiation into the water column control the survival of red algae and cyanobacteria, and they have developed dynamic metabolic responses besides optimization mechanisms in light harvesting antenna complex like phycobilisomes (PBS). This photoacclimation works at different times, like the complementary chromatic acclimation (CCA) in cyanobacteria. Previous studies from our laboratory using the red macroalga *Gracilaria chilensis* suggest that different light conditions could lead to a PBS reorganization, although through a mechanism different than CCA. We focus to study if light condition changes induce a global reorganization of PBS, precisely the levels of linker proteins that stabilize the PBS structure.

We start setting an *in vitro* culture of *Gracilaria chilensis* to study the transcriptional levels of genes coding linker proteins in response to a photoperiod, mimicking the time in hours of light and darkness for winter (8/16) and summer (16/8) seasons. We use photosynthetic efficiency as acclimation indicator to each photoperiod, reaching similar values respect control condition at day 16 of culture. Gene expression levels were assayed by RT-qPCR and primers were design using a transcriptome that we obtained from *G. chilensis* samples cultivated under a control photoperiod (12/12). This transcriptome was similar in expression pattern to those available for other red algae.

For relative expression analysis we demonstrated that geometric mean of TUBB2 and eRF3 reference genes is the best normalization. Then, we determined the expression levels of 4 structural PBS genes: Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF, and ApcC. With the exception of Linker γ^{33} , that shows high level in both photoperiods, we just observed

higher levels in winter condition respect control and summer, being the highest relative levels for ApcC, followed by Linker γ^{33} , ApcF, and Linker γ^{31} , respectively.

Our results together to previously published functional studies performed in red algae and cyanobacteria plus the complete structure of PBS structure for the red macroalga *Griffithsia pacifica* led us to propose a PBS model for *Gracilaria chilensis* where the higher level of these linker proteins increase light harvesting and conduction to photosystem II by increasing the number of PBS rods.



1 Introducción

1.1 Algas rojas y ficobilisomas

La naturaleza oxidante de nuestra atmósfera, con un cerca de 21% de oxígeno molecular, se debe a la llamada “gran oxidación”. Este evento geológico determinado por la acumulación de este elemento primero en la atmósfera y posteriormente en los océanos se ha datado entre 2.400 a 2.000 millones de años atrás y coincide temporalmente con la aparición de las cianobacterias (2.700 millones de años atrás) (Kiang, 2008). Estos organismos perfeccionaron la estrategia metabólica autotrófica que permite el uso de la energía solar para la fijación de carbono inorgánico dentro de biomoléculas, con la concomitante hidrólisis del agua y la liberación de oxígeno molecular, también conocida como fotosíntesis oxigénica (Nelson & Ben-Shem, 2004). Este tipo de fotosíntesis se mantuvo durante la evolución y fue incorporada a organismos eucariontes mediante endosimbiosis, teoría ampliamente aceptada en la actualidad. El primer evento de endosimbiosis de una cianobacteria ancestral (endosimbiosis primaria) se asume dió origen a los plastidios primarios (como los cloroplastos) presentes casi exclusivamente en el supergrupo *Archaeplastida* (reino *Plantae*) y al cual pertenecen los *phyla* *Glaucophyta* (algas unicelulares de agua dulce), *Viridiplantae* (algas verdes y plantas) y *Rhodophyta* (algas rojas) (Chan & Bhattacharya, 2011). Es desde este último *phylum* sobre el cual se tienen los restos fósiles más antiguos para un organismo sexuado (1.200 millones de años atrás) (Butterfield, 2000). Otros eventos de endosimbiosis tardíos, esta vez de algas rojas unicelulares, dieron origen a los plastidios secundarios y terciarios, los cuales a diferencia de los plastidios primarios presentan tres o cuatro membranas biológicas.

Las algas comprenden un grupo muy diverso de organismos que realizan fotosíntesis y que se extiende más allá del supergrupo *Archaeplastida*. Así tenemos el *phylum Cyanophyta* (cianobacterias) del reino Eubacteria, el *phylum Euglenophyta* (euglenoideos) del supergrupo *Excavates* (reino Protista), el *phylum Chlorarachniophytes* (amebas fotosintéticas) del supergrupo *Rhizaria* (reino Protista) y los *phyla Phaeophyta* (algas pardas), *Dinophyta* (dinoflagelados) y *Bacillariophyta* (diatomeas) pertenecientes al supergrupo *Chromalveolata* (Adl, y otros, 2005; Keeling, y otros, 2005; Cock & Coelho, 2011).

Rhodophyta y plantas superiores comparten la organización básica de complejos proteicos donde se lleva a cabo la primera fase fotosintética dependiente de luz: el Fotosistema I (PSI), Fotosistema II (PSII), Complejo Citocromo *b₆f* y ATP sintasa, junto a los mecanismos secuenciales de transferencia de electrones a través de estos complejos (Nelson & Ben-Shem, 2004). Sin embargo, un aspecto en el que difieren, es la presencia de complejos captadores de luz acoplados a los fotosistemas denominados antenas, los cuales presentan una composición y organización estructural de proteínas y pigmentos que es característico de cada organismo.

El estudio de la captación de luz en plantas superiores, cuyos centros de reacción contienen moléculas de clorofila, indicó una limitada absorción de fotones por segundo, lo que condiciona la dependencia de la eficiencia del proceso fotosintético a altos requerimientos lumínicos (Moroney & Ynalvez, 2009). La presencia de las antenas permite la optimización de la absorción y conducción de energía hacia los centros de reacción de los fotosistemas, aumentando así la eficiencia fotoquímica. Estos sistemas de conducción son indispensables para aquellos organismos que se desarrollan en ambientes de escasa luminosidad. Por ejemplo, algas rojas y cianobacterias presentan un tipo

particular de antena, el complejo multiproteico accesorio denominado ficobilisoma (PBS). A diferencia de las plantas superiores, donde los complejos antenas están anclados a los centros de reacción, los ficobilisomas en cianobacterias y algas rojas interaccionan con el PSII, sin estar unidos a la membrana *per se*, como se muestra en la Figura 1.

La composición de los PBS varía según especie, con una composición básica de oligómeros de subunidades α y β de ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) y aloficocianina (APC), estabilizadas entre sí por las proteínas *linker* (Glazer A. , 1982). Estos complejos son accesorios a los complejos antena y comparten la función de transferencia de energía hacia los fotosistemas, absorbiendo en longitudes de onda en rangos de 500 a 650 nm, en los que la clorofila no presenta máximos de absorción. La transferencia de energía a través del ficobilisoma se hace por medio de las ficobilinas, cromóforos que se encuentran unidos covalentemente a las ficobiliproteínas, y que median la transferencia de energía en resonancia de Förster, abreviado como FRET. En este mecanismo, un cromóforo dador transfiere su energía de manera no radiativa a un segundo cromóforo, denominado aceptor, a través del acoplamiento dipolo-dipolo de ambas moléculas (Förster, 1948). Las características espectroscópicas de los cromóforos, sus posiciones en los ficobilisomas y el ambiente molecular que les rodea, permiten que este complejo posea una alta eficiencia de transferencia de energía, alcanzando valores de rendimiento cuántico cercanos a un 95% (Grabowski & Gantt, 1978).

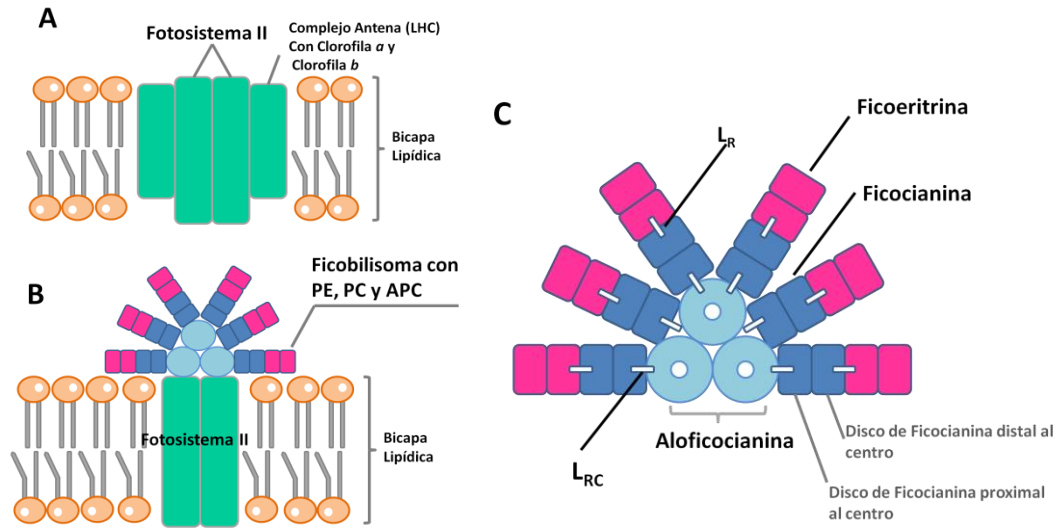


Figura 1: Esquema general de los complejos de antena en algas.

A. Diagrama de la organización de membranas tilacoidales presente en algas verdes y plantas superiores, donde las antenas se asocian con el Fotosistema II en la membrana. **B.** Diagrama de organización de membranas tilacoidales en algas rojas y cianobacterias, donde las antenas corresponden a ficobilisomas con sus respectivas proteínas estructurales [2]. **C.** Esquema de la organización general de ficobilisomas hemidiscoideales descritos en algas rojas [3], y proteínas que componen su subestructura: centro de Alococianina (o APC en celeste), varillas de Ficocianina (o PC en azul) y Ficoeritrina (o PE en rosado), y algunas proteínas linker que estabilizan el complejo (L_R o Linker Rod y L_{RC} o Linker Rod Core). Fuente: Elaboración propia

Por otra parte, los ficobilisomas de algunas especies de algas rojas presentan proteínas cromoforiladas adicionales, como las subunidades γ de los hexámeros de PE y algunas proteínas *linker*, optimizando la transferencia unidireccional de energía desde las varillas al centro de los ficobilisomas, y desde los PBS hacia los centros de reacción (Apt, Collier, & Grossman, 1995).

Las proteínas *linkers* constituyen alrededor de 15% del total de proteínas de los PBS, y su presencia es fundamental para que se lleve a cabo el correcto ensamblaje de ficobilisomas y la transferencia de energía a los fotosistemas (Apt, Collier, & Grossman, 1995). Las proteínas *linker* han sido clasificadas según su masa y localización en cuatro grupos: L_R , L_{RC} , L_C y L_{CM} (Glazer A. , 1985) (Tabla 1), donde L_R o *linker* de la varilla corresponden a un grupo de polipéptidos de masa de entre 27 y 35 kDa, y que participan en el ensamblaje de las subestructuras periféricas de varilla, específicamente en la unión de trímeros y hexámeros de PE/PC. En el segundo grupo L_{RC} o *linker* varilla – core, se encuentran los polipéptidos que participan en la unión de varillas a la sub estructura central, el *core* de APC, contribuyendo también en la estabilización de las estructuras de varillas. Su peso molecular varía entre 25-27 kDa. El grupo de L_c o *linker* core, está constituido por proteínas de baja masa molecular y su función es esencial en el ensamblaje de la ultra estructura del *core*. En el cuarto grupo se encuentra el L_{CM} o *linker* core – membrana, una proteína de masa variable entre 70 y 128 kDa relacionado con el número de hexámeros que componga el *core*, y cuya función consiste en el anclaje de los ficobilisomas a la membrana tilacoidal (Liu L. , Chen, Zhang, & Zhou, 2005; Adir, y otros, 2006).

Como se mencionó previamente, se determinó que las proteínas *linker* cumplen dos roles principales: el primero proveer de conexiones estructurales entre las ficobiliproteínas adyacentes y estabilizar la estructura del PBS, participando en el ensamblaje de estructuras triméricas y hexaméricas, donde para cada oligómero se ha encontrado al menos un *linker*, y el segundo modular la absorción y emisión de fluorescencia facilitando o participando directamente en la transferencia de energía desde las varillas al *core* y eventualmente a la clorofila contenida en las membranas tilacoidales de las células fotosintéticas (Glazer A., 1989). Es por esto que la ubicación de los *linkers* en el ficobilisoma es determinante en la función de complejo.

Por otro lado, se ha determinado que algunas de estas proteínas *linker* facilitan o restringen la elongación de las varillas periféricas. Estudios llevados a cabo en *Synechococcus 6301* mostraron que el aumento en la expresión del *linker* de la varilla $L_R^{8,2}$ inhibe la elongación de las varillas limitando el número de hexámeros que se ensamblan, por lo que se nombró *linker* terminal de las varillas (Lorimier, Bryant, & Stevens Jr, 1990). Por otra parte, estudios de reconstitución *in vitro* indicaron que los *linkers* de 30 y 33 kDa promueven la elongación de las varillas (Lundell & Glazer, 1983), hallazgo apoyado por estudios en la cianobacteria *Nostoc* que reportaban que una proteína *linker* de 29 kDa resultaba esencial para reconstituir el PBS, al favorecer el ensamblaje de hexámeros de PE-PC al *core*, facilitando de esta manera la estabilidad y mantención de la estructura del ficobilisoma.

Tabla 1: Listado de proteínas *linker* descritas en algas rojas y cianobacterias.

Proteína	Símbolo	Masa (kDa)[†]	pI[†]	Función Anotada	Gen
CpeC	PE L _R	31,8 – 33,1	9,6	<i>Linker</i> asociado a PC	cpcC
CpeD	PE L _R	27,9 – 28,4	8,2 – 8,6	<i>Linker</i> asociado a PC	cpeD
CpeE	PE L _R	27,1 – 28,4	9,7	<i>Linker</i> asociado a PE	cpeE
PepC	PEC L _R	31,3 – 31,5	9,6 – 9,7	<i>Linker</i> asociado a PEC*	pepC
CpcC	PC L _R	24,8 – 32,6	9,5 – 9,6	<i>Linker</i> asociado a PC	cpcC
CpcD	PC L _R	7,8 – 9,9	9,8 – 10,5	<i>Linker</i> terminal varilla	cpcD
CpcG	L _{RC}	26,8 – 31,9	9,3 – 9,6	<i>Linker</i> varilla – core	cpcG
CpcH	L _{RC}	30,4 – 30,8	8,8 – 9,7	<i>Linker</i> varilla – core	cpcH
CpcI	L _{RC}	32,7	8,9	<i>Linker</i> varilla – core	cpcI
ApcC	L _C	7,7 – 7,8	10,9 – 11,4	<i>Linker</i> asociado a APC	apcC
ApcE	L _{CM}	76,5 – 129,8	9,5 – 9,7	<i>Linker</i> core – membrana	apcE

([†]): Valores obtenidos empleando el *software* Antheptot v5.0.

(^{*}): Ficoeritrocianina.

Fuente: Traducida y modificadas desde (Liu L. , Chen, Zhang, & Zhou, 2005).

1.2 Fotosíntesis en rodófitas.

En términos generales, el proceso fotosintético se lleva a cabo en algas de modo similar respecto a plantas superiores. Descubrimientos históricos en algas han permitido avanzar y establecer principios básicos generales de fotosíntesis, desde la captación luminosa hasta el Ciclo de Calvin. Desde los experimentos de Thomas en el siglo XIX, quien estableció el “rango espectral” de longitudes de onda en que se liberaba oxígeno como producto de la fase clara en fotosíntesis y estudios de Emerson y Arnold a principios del siglo XX, que estimaron que 8 fotones eran necesarios para liberar 1 molécula de oxígeno, acuñando el término “unidad fotosintética”, se ha demostrado que la captación y transferencia luminosa es comparable entre algas verdes y plantas superiores, producto de la presencia de clorofila como pigmento principal en la estructura antena distribuyéndose de modo similar, además de contar con la mismos complejos enzimáticos que participan en la cadena transportadora de electrones y la fijación de carbono; aunque debe considerarse que difieren en la fuente de obtención de CO₂ y los pigmentos que componen las antenas (Moroney & Ynalvez, 2009).

La variedad de pigmentos presentes en el LHC y su organización en el PSI y PSII implica diferencias en la eficiencia fotosintética respecto a las distintas bandas espectrales que afectan la actividad fotosintética distribuída a lo largo de la columna de agua. El espectro de acción de fotosíntesis de algas rojas, correspondiente a la región central del espectro visible o espectro verde, fue descrito por Haxo y Blinks (Haxo & Blink, 1950), donde la luz verde produce tasas fotosintéticas mas altas debido a su absorción por las ficobilinas acopladas al PSII, transfiriéndose eficientemente a ambos centros de reacción. En contraste, la luz azul y rojo lejano no inducen a una alta tasa de transporte de electrones,

sino que a la separación de cargas y transporte cíclico de electrones en el PSI, y de menor manera la separación en el PSII, llevando a un bajo transporte de electrones en la cadena lineal y finalmente a una menor tasa de producción de oxígeno y consecuente menor fijación de carbono (Hanelt, Wiencke, & Bischof, 2003).

Durante la fijación del carbono en algas verdes, rojas y pardas, al igual que en plantas superiores, la enzima encargada de la fijación de CO₂ a la forma de una molécula de ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) y con la subsecuente generación de 2 moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA), es la enzima RuBisCO. Sin embargo, cuando los niveles de CO₂ bajan respecto de los de O₂, esta enzima también cataliza la incorporación de O₂ dentro de la RuBP, dando origen a 1 molécula de 3-PGA y una de fosfoglicolato (PG), en un fenómeno denominado fotorespiración. Este PG no puede ser usado en el Ciclo de Calvin, por lo que es hidrolizado en dos moléculas de CO₂, con la consiguiente pérdida del ATP y NADPH gastados en la síntesis de RuBP durante el ciclo de Calvin.

No obstante, el efecto de la fotorespiración es reducido en algas debido a mecanismos que permiten mantener altos los niveles de CO₂, denominados mecanismos de concentración de dióxido de carbono:

- En cianobacterias existe un alto transporte de bicarbonato hacia el citoplasma, el cual es rápidamente convertido a CO₂ por la acción de la enzima anhidrasa carbónica, que se encuentra rodeando las estructuras subcelulares denominadas carboxisomas, donde se encuentra la enzima RuBisCO. Esto crea una alta concentración de CO₂ cerca de la enzima, suprimiendo su actividad oxigenasa.

- En algas eucariontes y, al igual que en cianobacterias, la RuBisCO se encuentra acumulada dentro de estructuras cloroplastidiales denominadas pirenoides, las que se encuentran rodeadas de anhidrasa carbonica. Sin embargo, los mecanismos de captación del carbono son temas de debate ya que algunas algas captan bicarbonato mientras que otras captan CO₂, además de que no se han identificado completamente las identidades de los transportadores. De todas formas, la capacidad de captación de CO₂ por parte de las algas es mucho mayor que la observada en plantas superiores. (Moroney & Ynalvez, 2009).

Los productos obtenidos a lo largo de la fotosíntesis han permitido establecer distintas estrategias para determinar la eficiencia fotosintética en macroalgas. Las metodologías clásicas inicialmente consistían en el seguimiento de la evolución de oxígeno y asimilación de carbono, incorporándose a éstas hace un par de décadas el seguimiento de la fluorescencia de la clorofila a. La inducción de emisión de fluorescencia de clorofila (efecto Kautsky) ha logrado homologarse con determinaciones cuantitativas para la medición de parámetros fotosintéticos, siendo el método de Modulación por Amplitud de Pulso (PAM) el más utilizado para medir rendimiento cuántico y tasa fotosintética. Éste se basa en la señal de fluorescencia del PSII, que compite por la energía de excitación contra la conversión fotoquímica y la disipación de calor. Al hacer incidir un pulso fuerte de luz blanca, todos los aceptores de electrones del PSII se reducirán en menos de 1 segundo de exposición a energía de excitación, que se disipará como calor o fluorescencia. De esta manera, una menor señal de fluorescencia indicará una mayor disipación de calor, vía que compite con la conversión de energía fotoquímica, lo que significará una disminución del rendimiento cuántico del fotosistema (Hanelt, Wiencke,

& Bischof, 2003). Al llevar a cabo la medición con luz de baja intensidad y modulada, se induce a una señal de fluorescencia modulada que puede ser detectada por un instrumento incluso con ruido de luz ambiental. Al exponer plantas temporalmente a oscuridad se puede detectar cambios en la relación entre la fluorescencia variable (F_v) y la fluorescencia máxima (F_m), utilizándose como parámetro de fotoinhibición y recuperación (Krause & Weis, 1991). El parámetro de F_v se obtiene de la diferencia entre la Fluorescencia máxima obtenida cuando todos los centros de reacción del PSII están activos o “abiertos” y la Fluorescencia inicial (F_0), determinado bajo un pulso de luz saturante. El monitoreo de la dinámica de esta señal permite medir el rendimiento cuantico (F_v/F_m) en plantas expuestas previamente a oscuridad, en las que se ha demostrado consistencia con las mediciones de oxígeno, lo que lleva a considerar F_v/F_m un buen indicador en la medición de eficiencia fotosintética en macroalgas (Hanel, Huppertz, & Nultsch, 1992); (Hanelt, Melehersmann, Wieneke, & Nultsch, 1997).

1.3 Aclimatación en respuesta a cambios de luz.

La radiación solar constituye la fuente esencial energética para el desarrollo de la vida de las algas, por lo que su variación a través de la columna de agua determina la sobrevivencia de estos organismos, dependiendo su capacidad de desarrollo de las estrategias de aclimatación. Entre estas estrategias están las que permiten la optimización de la captación de luz (a través del espectro de irradiancia) por parte de los complejos recolectores, implicando además un balance dinámico entre la tasa de síntesis de derivados reductores y ATP, y su consumo en la fase oscura durante la fijación de carbono. Por lo

tanto, la “fotoaclimatación” involucra una serie de mecanismos que operan a distintos tiempos, incluyendo estados de transición, disipación térmica por vía del ciclo de xantofilas, expresión diferencial de carotenoides y cambios en la síntesis de proteínas pigmentadas que componen los complejos recolectores de luz (Falkowsky & LaRoche, 1991).

Entre los eventos de impacto ecológico se encuentra el efecto del aumento de la incidencia de radiación solar del tipo UV-B. Este tipo de radiación logra penetrar la columna de agua y alcanza ecosistemas marinos de mayor profundidad, provocando una modificación en la relación de las radiaciones UV-B, UV-A y la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que puede afectar las respuestas dependientes de luz en organismos acuáticos, incluyendo la fotosíntesis, la foto-orientación, la fotoinhibición y la fotoprotección. La mayoría de los organismos tiene mecanismos de protección y reparación que resultan efectivos, pero la exposición excesiva a la radiación solar UV puede sobrecargar esta capacidad (Häder, 2001). *Gracilaria chilensis* se puede adaptar a este tipo de estrés mientras se encuentra temporalmente en condiciones de baja luz, por acumulación un alto contenido de pigmentos fotosintéticos (Chl a y ficobilinas), mostrando una alta eficiencia cuántica (α) y un bajo índice de saturación de luz (E_k) tanto para luz UV como para luz PAR. Esto sugiere que *G. chilensis* no está adaptada al crecimiento en altas irradiancias ya que la radiación UV-B es perjudicial para la fotosíntesis cuando las algas crecen cerca de la superficie, por ejemplo, durante el período de verano (Gómez I. , Figueroa, Huovinen, Ulloa, & Morales, 2004).

A pesar que la composición proteica y organización de los ficobilisomas son características para las distintas especies de cianobacterias y algas rojas, y que esto pudiera

dar cuenta de un cierto grado de insensibilidad a cambios en respuesta a las condiciones de crecimiento, se ha observado que la composición de estos complejos accesorios puede variar en respuesta a ciertos estímulos ambientales como la disponibilidad de nitrógeno y de luz ambiental. Uno de los fenómenos caracterizados en diversas poblaciones de cianobacterias y algas rojas es la Adaptación Cromática Complementaria (CCA), en la cual a exposición a longitudes de onda de 540nm (verde) y 640nm (roja) durante intervalos de tiempos cortos lleva a una re-estructuración en las varillas de las especies *Fremyella diplosiphon*, *Noctoc* y *Synechocystis* (Kehoe & Gutu, 2006). Se ha visto en estas especies que la respuesta de CCA con luz verde provoca un aumento en la expresión de ficoeritrina, mientras que la exposición a luz roja lleva a un aumento en la expresión de ficocianina, y se ha propuesto que los fotoreceptores del tipo fitocromo RcaE, RcaC y RcaF como responsables del control transcripcional preferencial en esta respuesta de aclimatación (Kehoe & Gutu, 2006). En este contexto, algo más controversial ha sido el estudio en algas rojas de los cambios en la composición proteica de los ficobilisomas en respuesta a la variación de la intensidad de luz y fotoperíodos. Por una parte, se observó una disminución de los mensajeros codificantes de PE, PC, hemoxygenasa y enzimas relacionadas con la síntesis de la bilinas como respuesta a cambios de intensidad luminosa (Ritz, Thomas, Spilar, & Etienne, 2000). La aclimatación a alta intensidad de luz de los PBS de *Porphyrum cruentum* mostró la reducción de un 25% en el contenido de PE (Cunningham, Dennenberg, Mustardy, Jursinic, & Gantt, 1989), mientras que en estudios cinéticos de fotoaclimatación en *R. violácea* se observó disminución de PE en los extremos distales de las varillas de los PBS frente al aumento de la intensidad luminosa. Esta modificación en el contenido de PE se vio acompañada con la disminución del *linker* de 33 kDa (Garnier, Dubacq, & Thomas, 1994) y, aunque se observó una notoria disminución de PE en las

estructuras de varilla, la topología de los PBS permaneció sin cambios (Bernard, Etienne, & Thomas, 1996). Las algas rojas también responden a intensidades de luz, en el caso de *Gracilaria changii* se observó una disminución del *linker* $L_C^{7,8}$ y del *linker* γ (Ho, Teoh, Rahim, & Phang, 2009). Estudios en esta misma especie mostraron la disminución del *linker* $L_C^{7,8}$, identificado como el *linker* terminal de varillas (CpcD), frente a períodos prolongados de oscuridad (Ho y col, 2009). Estudios preliminares llevados a cabo en *Gracilaria chilensis* concuerdan con los reportes de literatura, encontrándose una disminución de PE durante la purificación de proteínas de muestras recolectadas en verano, que se relacionó como respuesta en *G. chilensis* a un aumento en la intensidad luminosa y cambio en fotoperíodo, y que podría provocar la disociación de la ficoeritrina periférica desde las varillas (Bruna Jofré, 2001). Al aclimatar cultivos de *G. chilensis* a distintas intensidades lumínicas ($350 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $90 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) y posteriormente aislar ficobilisomas desde gradiente de sacarosa, se identificaron 2 subpoblaciones de ficobilisomas (Pouchucq, 2002); si bien esta observación permite inferir que las distintas condiciones de luz podrían provocar una reorganización a nivel de complejo, no permite concluir que sea comparable con la adaptación cromática complementaria, dado que no se observaron las características fisiológicas observadas en ficobilisomas de cianobacterias y tal vez corresponda a algún mecanismo de aclimatación que prevenga el daño causado por condiciones saturantes de luz. Estas observaciones nos sugieren que cambios en tiempos cortos en condiciones de luz podrían provocar respuestas en la organización general de los ficobilisomas y que podrían relacionarse con proteínas cuya función sea estabilizar la estructura del complejo (o proteínas *linker*); ahora bien, se ha estudiado en diversos organismos la respuesta a cambios en intensidad asociándose a respuestas de

fotoprotección, pero poco se ha profundizado respecto al efecto que puede tener sobre la organización estructural en respuesta a la transición estacional y cambios en fotoperíodos asociados a éstas, y que ocurren a tiempos más largos. Creemos que la capacidad de *G. chilensis* de habitar determinados nichos con diversas características e independiente de la estación del año en transcurso se debe una eficiente capacidad de aclimatación a nivel de organización de ficobilisomas y diferente de CCA, por lo que en esta tesis se propone estudiar los cambios transcripcionales en respuesta a cambios de fotoperíodos que podrían darse a nivel de los genes que codifican para las proteínas *linker*, simulando condiciones de horas luz/oscuridad de las estaciones invierno y verano.



2 Hipótesis de trabajo

La aclimatación de *G. chilensis* a los fotoperíodos relacionados a las estaciones de verano e invierno se traduce en cambios en los niveles de expresión relativos de los genes que codifican las proteínas *linkers* de ficobilisomas.



3 Objetivo General

Determinar los cambios en los niveles transcripcionales de los genes que codifican para las proteínas *linkers* de los ficobilisomas de *Gracilaria chilensis* en respuesta a distintos fotoperíodos.

4 Objetivos Específicos

4.1 Estandarizar el cultivo de *Gracilaria chilensis in vitro* bajo los fotoperíodos en estudio.

4.2 Obtener las secuencias codificantes de las proteínas *linkers* de interés en *Gracilaria chilensis* mediante RNA-seq.

4.3 Cuantificar de forma relativa normalizada los niveles de expresión de los RNA mensajeros codificantes de las proteínas *linker* de *Gracilaria chilensis* aclimatada a los fotoperíodos en estudio

5 Materiales

5.1 Enzimas modificadoras del DNA.

Transcriptasa reversa (RT): Esta enzima se empleó en la síntesis de cDNA desde RNA total. Durante esta tesis se empleó la enzima SuperScript II corresponde a una mutante de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia de Moloney del ratón, que presenta menor actividad RNasa H y mayor estabilidad térmica.

DNA polimerasas: Necesaria para la amplificación por PCR en tiempo real de fragmentos de DNA. Empleamos dos kits de amplificación que contenían versiones modificadas de la enzima *Taq* DNA polimerasa. Para los ensayos preliminares de estandarización se empleo el kit HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne), mientras que para los ensayos finales se empleo el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix (Agilent).

DNA nucleasa: Se utilizó para la digestión de DNA genómico, en la preparación obtenida de RNA total. La enzima recombinante TURBO DNA-free (AM 1907, Ambion) se obtuvo desde Ambion y se utilizó a una concentración de 0,04 U/μl.

5.2 Reactivos y soluciones.

Acetato de Sodio (3 M, pH 5.2) (Merck. Solución autoclavada)

Agarosa (SeaKem LE, Lonza)

Agua DEPC (0,001 % v/v DEPC (Winkler). Solución incubada toda la noche y luego autoclavada)

Agua libre de nucleasas, grado biología molecular (HyClone)

Bromuro de Etidio (10 mg/ml, en solución etanólica, Merck)

Buffer de carga ácidos nucleicos A (6x: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 30% glicerol)

Buffer de carga ácidos nucleicos B (Corresponde al *buffer 5x Green GoTaq Flexi*, Promega)

Buffer de dilución de la DNasa I (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 4 mM MgCl₂; 21 mM CaCl₂; 2 mM DTT; 90 mM NaCl)

Cloruro de Guanidina 6M (Sigma. Solución filtrada, 0,2 μm)

Cloruro de Guanidina 0,3M en 95% Etanol

dNTP 10 mM (en agua libre de nucleasas, desde soluciones stock individuales 100 mM de cada desoxirribonucleótido, Promega)

Estándar de RNA (*RNA ladder High Range*, Fermentas). Bandas (pb): 200, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000.

Estándar de DNA de rango amplio (λ *DNA/HindIII*, Fermentas). Bandas (pb): 125, 564, 2.027, 2.322, 4.361, 6.557, 9.416, 23.130.

Estándar de DNA de rango amplio (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas)

Bandas (pb): 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000, 10.000

Estándar de DNA de rango pequeño (*O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder*, Fermentas)

Bandas (pb): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500

Estándar de DNA de rango pequeño (*100 pb DNA ladder*, New England Biolabs)

Bandas (pb): 100, 200, 300, 400, 500, 517, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.200, 1.517

Etanol absoluto (Merck)

Etanol 70% (v/v) (Dilución del etanol absoluto, Merck)

Fenol/cloroformo (Fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1, Merck)

Isopropanol (Merck)

Proteinasa K 20 mg/ml (libre de DNasa, Fermentas)

RNasin Plus 40 U/ μ l (Inhibidor de RNasas, Promega)

TAE 50 \times (2,5 M Tris-acetato, 0,05 M EDTA, pH 8.5, Merck)

TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

TRIzol (Invitrogen)

Nota 1: Para la preparación de todas las soluciones acuosas se empleó agua *nanopure*.

Nota 2: A menos que se indique, los reactivos fueron obtenidos desde Merck, de calidad proanálisis y libres de actividad nucleasa.

Nota 3: Cuando se trabajó con RNA, se prepararon las soluciones con agua DEPC.

5.3 Medios de cultivo.

Medio PES (*Provasoli Enriched Seawater*): (Provasoli, 1968) El medio fue preparado en el laboratorio FICOLAB según el protocolo indicado en (Starr & Ziikus, 1993). Se preparó una solución concentrada de macronutrientes, la que se utilizó para enriquecer agua de mar filtrada (filtro nitrocelulosa 0,22 μ m de diámetro) y autoclavada, a una concentración

final de 20 ml por litro de agua de mar, según el protocolo estandarizado para el cultivo en *batch* de microalgas.

5.4 Oligonucleótidos y fragmentos de DNA.

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa IDT y fueron resuspendidos en 200 µl de agua libre de nucleasas, volumen que corresponde a la solución stock. La concentración µM del stock fue determinada a partir de la concentración obtenida por absorbancia a 260 nm. Las soluciones stock de oligonucleótidos fueron almacenados a -20°C.

RT-qPCR *eRF G. chilensis*:

Sentido: 5'-ACGACCAAGGACTGAAAGCCAT -3'

Antisentido: 5'-ATTACCGGTGAGCACAAGCAGA -3'

RT-qPCR *GAPDH G. chilensis*:

Sentido: 5'-TGAGAAACCGTTCGGGCATGAT -3'

Antisentido: 5'-GCTCTTGACATGATAGCGGTTCCA -3'

RT-qPCR *Actina G. chilensis*:

Sentido: 5'-ACGTCGCTATTCAGGCTGTACT -3'

Antisentido: 5'-CGACCAGCGAGATCAATTCGAAGA -3'

RT-qPCR *IF4α2 G. chilensis*:

Sentido: 5'-GCAGAGGCAAGAACGACAATGA -3'

Antisentido: 5'-GCAGAGGCAAGAACGACAATGA -3'

RT-qPCR *Tubulina beta 2 G. chilensis*:

Sentido: 5'-GGAGTGGATCCCGCATAACATCAA-3'

Antisentido: 5'-CTCGCCACATACCAATGCAAGAA-3'

RT-qPCR *Tubulina alfa G. chilensis*:

Sentido: 5'-CTGGGAGCTTTACTGCATGGAACA-3'

Antisentido: 5'-TCGTCAATAACGGTGGGCTCAA-3'

RT-qPCR *IF4A1 G. chilensis*:

Sentido: 5'-ATACGCTGTGCGACTTGTACGA-3'

Antisentido: 5'-TGCCCGAAAGGCTTCCATAACA-3'

RT-qPCR Tubulina beta *G. chilensis*:

Sentido: 5'-GCGGAATCGTTTGTCTACAAGCTG-3'

Antisentido: 5'-TCAAGCATAACTGCTCGGGGTACA-3'

RT-qPCR EF1 alfa *G. chilensis*:

Sentido: 5'-GGTCGTGTTGAACAAGGTGTCATC-3'

Antisentido: 5'-CCGACATGAGGCATGTTCAACTTC-3'

RT-qPCR Ubiquitina *G. chilensis*:

Sentido: 5'-GACTGATTTTCGCTGGCAAGCA -3'

Antisentido: 5'-CTTCCTGTCGCAGTTTGTTCACG-3'

RT-qPCR UBCE *G. chilensis*:

Sentido: 5'-GCTGTCTTTCATTACGAGGAAGCA-3'

Antisentido: 5'-CCGCGGTCAATCAGAGCAAATTC-3'

RT-qPCR Linker Gamma 31 *G. chilensis*:

Sentido: 5'-CACCAAGTACCCAAAGCTTTCCAG-3'

Antisentido: 5'-CTCGTTGCAGGACGAATTGTACAC-3'

RT-qPCR Linker Gamma 33 *G. chilensis*:

Sentido: 5'-TCAAGCGTTCGGCTGTTCCATT-3'

Antisentido: 5'-CGTTGGCCATAGTGAAAGCAAGA-3'

RT-qPCR ApcF *G. chilensis*:

Sentido: 5'-CACCTACTATTAGAAGCATTAAAGCTTT-3'

Antisentido: 5'-TTAGATATCTTCTTCGCTTAAGTTTTTAATTA-3'

RT-qPCR ApcC *G. chilensis*:

Sentido: 5'-GACTCTTTACATTCCGCGAGTTGC-3'

Antisentido: 5'-AGGTGTTTCCCACTGACCTCATCT-3'

6 Métodos

6.1 Cultivo de *Gracilaria chilensis*.

Todas las muestras de *Gracilaria chilensis* se obtuvieron desde la Bahía de Coliumo, localización 36°33'16.17"S 72°56'09.17".

Se recolectaron 10 individuos desde distintos puntos de la Bahía, reconocidos como individuos femeninos por su estructura reproductiva cistocárpica, y se transportaron en agua de mar del sitio de recolección en un recipiente semi cerrado al Laboratorio de Ficología de la Universidad de Concepción.

Se seleccionaron 2 g de cada individuo para la determinación de fluorescencia de clorofila previa al cultivo (día 0), y el resto de los especímenes se prepararon para cultivo, lavándose con cepillo y agua corriente para remover epífitos. Se llevó a cabo cultivos por triplicado (para cada condición que se detallará a continuación), donde cada réplica consistía en 2 g de cada individuo seleccionado en un volumen de 5 L de medio Provasoli (densidad final 4g/L), con burbujeo constante y recambio de medio de cultivo cada 3 días. La incubación se llevó a cabo en cámaras termorregulada a 17°C, irradiados con luz PAR a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes Ecolite (40 Watts, Phillips) ajustado por cuantómetro Licor-250 (LI-COR, USA).

Para el diseño experimental, se acondicionaron 3 cámaras de cultivo en paralelo según las condiciones de irradiancia, temperatura y burbujeo previamente descritas; la primera cámara se ajustó a fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, la segunda cámara se ajustó a fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y la tercera cámara se ajustó a 16 horas de oscuridad y 8 horas de luz. Los 3 cultivos se iniciaron simultáneamente con una condición inicial de fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (similar a la condición ambiental de recolección), para luego de 4 días de cultivo ajustarse a cada fotoperíodo ya descrito, hasta completar un tiempo final de 12 días de cultivo.

6.2 Medición de fluorescencia de clorofila

La evaluación del estado de aclimatación a las condiciones de cultivo *in vitro* de los individuos se realizó mediante el estudio de rendimiento cuántico de fluorescencia de PSII. Se midió *in vivo* la fluorescencia emitida por el PSII utilizando un fluorímetro de pulso modulado (*Junior PAM Chlorophyll Fluorometer*, Walz Mass Regeltechnik, Walz, Alemania). Se tomaron 10 muestras individuales de cada condición de cultivo, se incubaron durante 20 min en oscuridad y se midió el rendimiento cuántico de fluorescencia (F_v/F_m), el cual es indicador de eficiencia cuántica (Schreiber, Bilger, & Neubauer, 1994). Adicionalmente se estimó la tasa de transporte de electrones (ETR) a través de las curvas de luz vs. Fotosíntesis. Para las mediciones, los tallos fueron irradiados con intensidades crecientes de luz PAR (0 a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) proveniente de la lámpara halógena del equipo *Junior PAM* (Schreiber, Bilger, & Neubauer, 1994).

6.3 Extracción de RNA total mediante columna de sílice

Para la extracción de RNA total desde muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a los distintos fotoperíodos, se utilizó el kit RNeasy Plant Mini Kit (74904, QIAGEN), según las instrucciones del fabricante.

Este método permite la lisis celular en presencia de un agente caotrópico y de detergente, agentes que permiten inhibir las RNasas y que favorecen la adsorción del RNA en una columna de gel de sílice en presencia de una alta concentración de sales. Brevemente, tras lavar 0,5g de cada muestra, se maceró en N_2 líquido y el pulverizado resultante se depositó en un tubo de plástico y se le añadió 450 μL de buffer de lisis que se suplementó con 10 μL de DTT, procesándose inmediatamente con pistilo plástico. La mezcla se transfirió a la precolumna y se centrifugó a máxima velocidad, descartándose membranas sin digerir. La columna utilizada se descartó y el eluido obtenido se mezcló con 0,5 x vol de ETOH absoluto, para luego cargarse en la columna de sílice y centrifugarse a 12000 xg durante 15s. La columna se lavó con 700 μL de buffer RW1, posteriormente con 2 volúmenes de 500 μL de buffer RPE, cada etapa separada por centrifugación a 12000 xg durante 15 s. Después del último lavado, la columna fue secada por centrifugación a 16.100xg por 5 minutos a temperatura ambiente. La columna fue

colocada en un nuevo tubo colector, se agregaron 30 μ l de agua libre de nucleasas en el centro de la columna, se dejó hidratar por 10 min y la columna finalmente fue centrifugada a 16.100 \times g por 2 min. El eluato contiene el RNA total.

La pureza del RNA fue estimada a partir de las relaciones de absorbancias 260nm/280nm y 260nm/230nm mientras que la concentración fue calculada por fluorimetría empleando una sonda fluorescente específica para RNA contenida en el kit *Qubit RNA HS Assay* (Invitrogen). La integridad del RNA fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con EtBr en el que se cargó 1 μ l de RNA total más un estándar de RNA de concentración conocida.

6.4 Digestión con DNasa

Se llevó a cabo esta etapa de modo previo a la secuenciación de transcritos y PCR en tiempo real. Para la digestión con DNasa se utilizó el kit comercial TURBO DNA-free Kit TURBO DNase Treatment and Removal Reagents (AM1907, Ambion) según recomendaciones del fabricante. Al finalizar la digestión, se estimó la pureza del RNA a partir de las relaciones de absorbancias 260nm/280nm y 260nm/230nm mientras que la concentración fue calculada por fluorimetría empleando una sonda fluorescente específica para RNA contenida en el kit *Qubit RNA HS Assay* (Invitrogen). La integridad del RNA fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con EtBr en el que se cargó 1 μ l de RNA total más un estándar de RNA de concentración conocida. El cDNA fue generado empleando 1 μ g de RNA total y las muestras de RNA fueron almacenadas a -80°C.

6.5 Secuenciación

Se tomó iguales cantidades de 3 muestras aclimatadas durante 4 días a condición control 12/12 horas de luz/oscuridad, de tal modo de obtener concentraciones de RNA similares para preparar un pool, calculándose la pureza mediante relación de absorbancia A_{260}/A_{280} con *Nanodrop ND1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) mientras que la integridad del RNA se visualizó por electroforesis en gel de agarosa/formaldehido y por medición de RIN usando *2200 TapeStation System* (Agilent, CA, USA). Se precipitó un microgramo de RNA total con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M. Se preparó una librería desde el pool de RNA total usando el kit *TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2* (Illumina, San Diego, CA, USA) y se secuenció usando la plataforma de análisis de RNAseq *MiSeq* (Illumina) con corridas de 2×250 *paired-end reads* en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuática, *Interdisciplinary Center for Aquaculture Research* (INCAR). Seguido a esto, los datos se filtraron según largo y calidad, usando un corte de calidad de 0,05 y filtro de lecturas entre 50 y 1.000 pares de bases, realizando el filtro con *CLC Genomics Workbench software* (v8.1, CLC Bio, Denmark), obteniendo 755.242 lecturas. Los análisis posteriores se realizaron usando *CLC Genomics Workbench software*. El proyecto de transcriptoma se depositó en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank bajo el código de acceso GEZJ000000000 y SRR3673237.

6.6 Ensamblaje *de novo* y anotación

El ensamblaje *de novo* se llevó a cabo usando el *software CLC Genomics Workbench* (v8.1, CLC Bio, Denmark). Para los alineamientos, se utilizó un costo de penalización por mismatch de 2, costo por inserción de 3, largo mínimo de *contigs* de 200 pares de bases, y similitud de 0.8. Finalmente, se obtuvo 12.694 *contigs* con un largo promedio de 1.756 pares de bases. Se realizó una anotación funcional de acuerdo al análisis ontológico de genes (GO) con el *software Blast2Go* (Götz, y otros, 2008) utilizando Blastp contra una base de datos no redundante de proteínas de algas obtenida

desde NCBI, considerando un valor de corte E-value de $1E-10$, anotándose 13.749 secuencias, correspondiente al 96,64% de ellas.

6.7 Transcripción reversa.

Metodología utilizada para obtener cDNA desde RNA total, utilizando la enzima transcriptasa reversa. El cDNA sintetizado se empleó para la detección indirecta de la expresión de mRNA. La reacción se realizó según el protocolo descrito por el fabricante de la enzima SuperScript III (Thermo Scientific) con modificaciones. Por cada muestra, se empleó 1 µg de RNA total, 1µl de Random Primers (dilución 1:5 del producto 48190011, Thermo Scientific), 1µl dNTP 10 mM (500 µM final) y agua libre de nucleasas hasta completar 15 µl. Se calentó la mezcla a 65°C por 5 min y luego se enfrió con hielo para posteriormente adicionar a cada tubo 4 µl 5× *First Strand Buffer*, 1 µl DTT 0,1M, 1µl de *RNase Out Plus* (Promega) y 1µl de *Super Script III RT* (200 U/µl) y se mezcló a temperatura ambiente. Se incluyó un control negativo de RT (No-RT) al que no se le agregó la transcriptasa reversa. Se calentó a 25°C por 5 min y luego a 50°C por 60 min, inactivando posteriormente la enzima a 70°C por 15 minutos. Los cDNA fueron diluidos 10 veces en agua libre de nucleasa y almacenados a -20°C.

6.8 PCR en tiempo real.

Se empleó para la detección relativa de los niveles de expresión de un mRNA poliadenilado de interés con respecto de un gen de referencia. Esto a través de la amplificación de un cDNA representativo de los mensajeros presentes en una muestra de RNA total, obtenida por transcripción reversa (RT-qPCR). En todos los ensayos se empleó el equipo Mx3000P (Stratagene), y para la detección se utilizó el agente intercalante de DNA “SYBR-Green”, o su similar “EVA-Green”. La reacción estándar utilizada se encuentra indicada en el apéndice 12.1. El ciclo umbral (C_t) se definió como el ciclo en el que la fluorescencia del DNA amplificado fue mayor a la fluorescencia umbral, calculada mediante el método basado en amplificación (*amplification-based threshold*) descrito por el fabricante del equipo (Agilent Technologies, Inc., 2004). La cuantificación relativa de

la muestra se realizó por el método de interpolación desde una curva estándar (Bookout, Cummins, Kramer, Pesola, & Mangelsdorf, 2006). Básicamente, se realizó una curva estándar a partir de diluciones seriadas (1/10) del producto de PCR obtenido para cada set de partidores. Se realizó qPCR para cada dilución, abarcando al menos 5 diluciones cuyo C_t estaban en torno al C_t de las muestras. Se interpolaron los valores del gen de interés (GOI) en las muestras y se dividieron por los valores del gen de referencia en las mismas muestras. Finalmente, los valores se normalizaron como veces respecto de la condición control. Para el diseño de partidores se empleó el programa AmplifX (*Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille*), eligiendo aquellos sets de partidores que fueran específicos para cada GOI (*Primer Blast*), que hibridaran en exones diferentes y cuya curva de disociación teórica mostrase un solo pico (μ Melt, University of Utah). Así, normalmente los partidores sintetizados poseían valores de eficiencia de amplificación (obtenido a partir de la pendiente de la curva estándar) superior al 95%.

Nota: Debido a que los partidores fueron diseñados de forma de poseer una T_m de 60°C y amplificar un fragmento de entre 150 a 200 pb, el programa de amplificación fue el mismo en cada caso, sólo estandarizándose la concentración de oligonucleótidos en caso de observar la generación de dímeros de partidore.

6.9 Electroforesis de RNA en gel de agarosa y fotodocumentación.

La resolución de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales de las muestras de *G. chilensis* se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Se cargó 1 μ l directo de cada RNA total en mezcla con 1 μ l de agua libre de nucleasas y 2 μ l del buffer de carga desnaturalante *RNA loading buffer 2 \times* (Thermo Scientific). La mezcla de carga fue desnaturalada a 70°C por 5 minutos y luego se mantuvo en hielo. En paralelo, se cargaron 4 μ l del estándar de RNA *RiboRuler High Range RNA Ladder Ready-to-Use* (SM1823, Thermo Scientific).

Electroforesis en gel de agarosa: Los geles fueron confeccionados de acuerdo al volumen y número de muestras analizar. Dependiendo del tamaño del RNA analizado, la concentración de agarosa varió entre 1 a 2% en *buffer TAE 0,5 \times* con EtBr a una

concentración final de 0,05 µg/ml. Las muestras fueron corridas 100 Volts durante 30 a 50 minutos para geles analíticos.

Fotodocumentación: Los geles fueron documentados en un transiluminador acoplado con una cámara fotográfica (Vilber Lourmat), en un formato de imagen en negativo.

6.10 Análisis de la estabilidad en la expresión de genes de referencia.

NormFinder: Realiza una evaluación de la variabilidad de un gen de referencia entre muestras agrupadas en diferentes grupos de análisis bajo la fórmula:

$$y_{igj} = \alpha_{ig} + \beta_{gj} + \varepsilon_{igj}$$

Donde y_{igj} corresponde al valor de amplificación (C_t) linealizado (transformado al aplicar logaritmo, o después de su interpolación sobre una curva estándar) para un gen i de un grupo g desde la muestra j . α_{ig} representa el valor de expresión general del gen i dentro del grupo g . β_{gj} representa la cantidad del mRNA del gen i en la muestra j . ε_{igj} representa la variación al azar de la medición del gen i debido a factores biológicos y experimentales, con media cero y varianza σ^2_{ig} .

La variación dentro de un grupo (σ^2_{ig}) es definida como la sumatoria de los residuos (diferencia entre los valores experimentales respecto del valor teórico obtenido por una regresión con todos los datos) al cuadrado, dividida por un factor que considera el tamaño muestral del grupo y el número de genes en la muestra.

La variación entre los grupos corresponde a la diferencia en el nivel de expresión de un gen i entre los distintos grupos (G) denominada δ_{ig} :

$$\delta_{ig} = \alpha_{ig} - \bar{\alpha}_i.$$

Donde $\bar{\alpha}_i$ corresponde al promedio del valor α_{ig} entre los grupos G .

El algoritmo entrega un valor de estabilidad (ρ_{ig}) que corresponde a suma de la variación entre los grupos más la variación dentro del grupo para un gen dado. Debido a que los cálculos necesarios para calcular ambos parámetros son complejos, empleamos la aplicación para Excel (Microsoft Corporation) de NormFinder descargable desde el sitio web (<https://moma.dk/normfinder-software>). El detalle de las ecuaciones,

simplificaciones de cálculos y ejemplos de cálculos se encuentran en la información complementaria a la publicación original (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004).

geNorm: Realiza una evaluación de la estabilidad en la expresión de un gen respecto de otro (comparación en pares). Para cada combinación de genes j y k , en un arreglo de A_{jk} de m elementos se calcula el logaritmo en base 2 de cociente entre a_{ij}/a_{ik} .

$\forall j, k \in [1, n] \wedge (j \neq k)$

$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left(\frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left(\frac{a_{mj}}{a_{mk}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{ik}} \right) \right\}_{i=1 \rightarrow m}$$

Además, se define la variación de los pares (V_{jk}) como la desviación estándar de los A_{jk} elementos. Finalmente, se define el valor de estabilidad de expresión (M_j) para el gen de referencia j que corresponde al promedio de todas sus variaciones de los pares (V_{jk}).

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n - 1}$$

Debido a que el software geNorm requiere de licencia de uso, realizamos los cálculos de M_j empleando una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Corporation) usando las ecuaciones antes enunciadas, y que fueron descritas en la publicación (Vandesompele, y otros, 2002).

7 Resultados

7.1 Objetivo específico 1

Estandarizar el cultivo de *Gracilaria chilensis in vitro* bajo los fotoperiodos en estudio.

7.1.1 Cultivo y aclimatación

El objetivo principal de este trabajo de tesis es identificar cambios transcripcionales de proteínas *linker* que podrían darse durante la aclimatación a cambios estacionales en *G. chilensis*, por lo que inicialmente se establecieron las condiciones del modelo experimental simulando la transición desde estaciones intermedias (otoño/primavera 12 horas luz/12 horas oscuridad) a estación de verano o invierno, correspondiendo al modelo de invierno con fotoperíodo de 8 horas luz y 16 de oscuridad, verano con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y se estableció una condición control de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El muestreo se realizó en la bahía de Dichato, sector “El Litril”, (Figura 2) donde se escogieron 10 individuos identificados como femeninos (ver métodos), y a partir de estas muestras se llevaron a cabo cultivos por triplicado para cada condición en estudio. Para la secuenciación se utilizaron muestras en aclimatación a la condición de fotoperíodo control. Hasta ese momento se contaba con las secuencias codificantes presentes en el DNA cloroplastidial, que correspondían a proteínas estructurales de ficobilisoma como PE, PC, APC y *Linker core* – membrana, sin embargo, gran parte de las proteínas *linker* de la varilla se encuentran codificadas en el genoma nuclear, de los cuales sólo se habían identificado 2 hasta la fecha en otras algas rojas, los cuales podrían tener secuencias altamente divergente con nuestro organismo modelo (Xiangyu, Song, Fangqing, Xiaowen, & Xuexi, 2007).

El seguimiento de la aclimatación de las muestras de *Gracilaria chilensis* se llevó a cabo determinando la eficiencia fotosintética (Figura 3) según el parámetro Fv/Fm (Genty, Harbinson, Cailly, & Rizza, 1996), considerándose el valor teórico óptimo de 0,832 (Björkman & Demmig, 1987). A partir de las mismas determinaciones se obtuvo la Tasa de Transporte de Electrones (ETR) (Apéndice 13.2), para las condiciones de aclimatación descritas previamente.

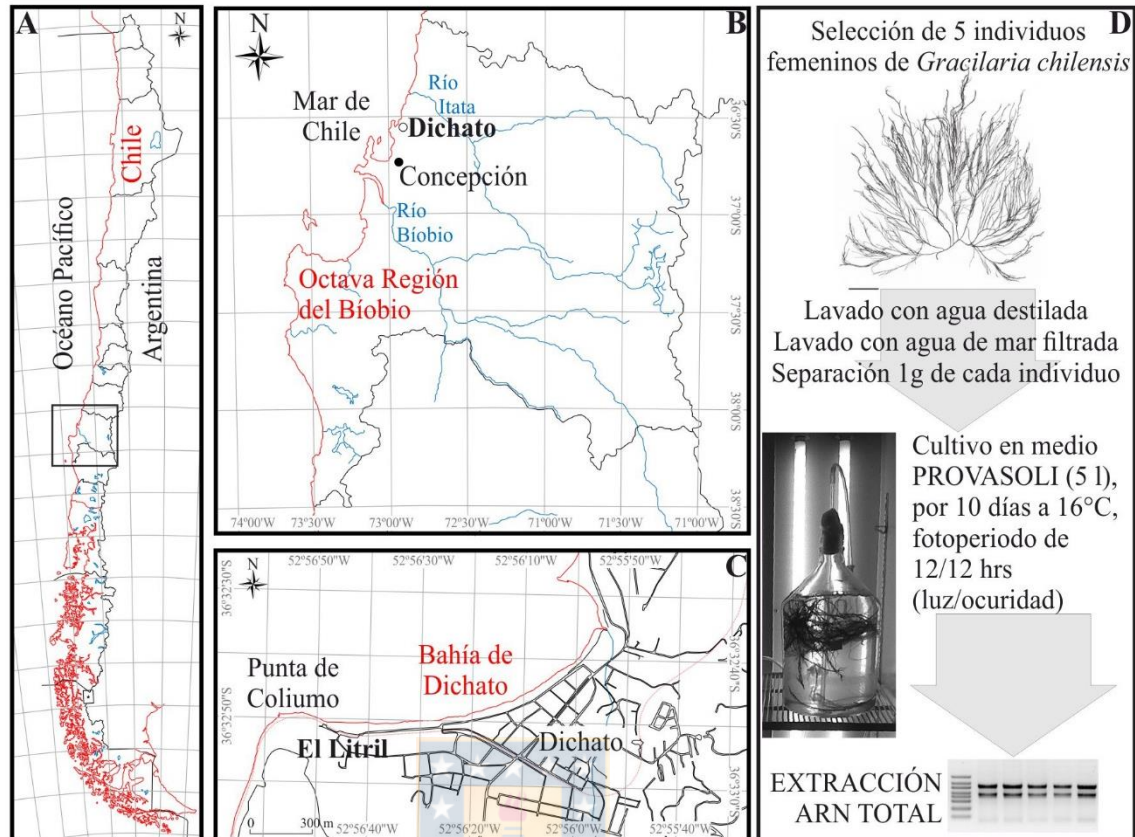


Figura 2: Esquema de la estrategia muestral para la obtención de los individuos de *Gracilaria chilensis* y de su cultivo *in vitro* para la extracción del RNA total usado en el ensayo de RNA-seq.

Esquema de la estrategia muestral para la obtención de los individuos de *Gracilaria chilensis* y de su cultivo *in vitro* para la extracción del RNA total usado en el ensayo de RNA-seq. **A-C:** Ubicación geográfica del área de recolección de los individuos de *Gracilaria chilensis* y que corresponde a la bahía de Dichato, sector el Litril (36°33'16.17"S 72°56'09.17"W). **D:** Esquema general de la selección y preparación de las 5 muestras de *G. chilensis* que fueron cultivadas *in vitro* bajo una condición de fotoperíodo denominada control (12/12 hrs, luz/oscuridad). Desde estas muestras se extrajo el ARN total que fue empleado en el ensayo de RNA-seq. Fuente: Elaboración propia.

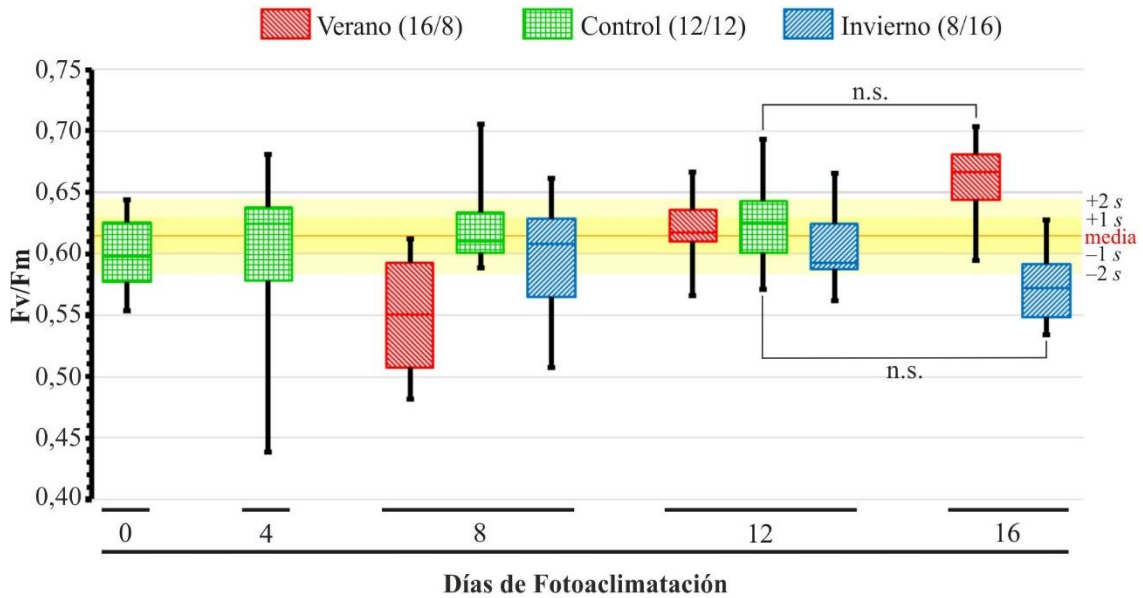


Figura 3: Análisis de la eficiencia fotosintética en las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperíodos.

Gráfico de cajas que muestra la evolución temporal del índice de máxima eficiencia fotoquímica F_v/F_m , determinadas desde individuos de las poblaciones en aclimatación a los fotoperíodos de verano, control e invierno (horas de luz/horas de oscuridad) medidas a 0, 4, 8, 12 y 16 días en cultivo. Los valores de F_v/F_m se obtuvieron a partir de las curvas de luz, desde las que se determinó el máximo rendimiento cuántico de cada muestra sometida previamente a oscuridad. Las cajas indican los rangos intercuartiles 2 y 3, separados por la mediana ($N_{\text{grupo}} = 5$). Las barras de error corresponden a los valores máximos y mínimos de cada grupo. Se indica además en el gráfico el valor promedio (media) de las medianas para las muestras del grupo control en los distintos días (línea roja), además de los intervalos comprendidos dentro de ± 1 y 2 desviaciones estándar (s) (rectángulos de color amarillo). La diferencia entre las medianas de los valores de eficiencia fotosintética obtenidas desde la última medición para las muestras de cada grupo fue analizada mediante una prueba Kruskal-Wallis (n.s.: no significativo). Fuente: Elaboración propia.

7.2 Objetivo específico 2

Obtener las secuencias codificantes de los genes de interés en *Gracilaria chilensis* mediante RNA-seq.

7.2.1 Secuenciación, ensamblaje y anotación de transcriptoma de *Gracilaria chilensis*

Una vez finalizada la aclimatación de los cultivos de *G. chilensis* de acuerdo a las condiciones descritas, fue posible obtener el RNA total de todas las muestras (Apéndice **13.3A**), de las que se seleccionó 4 candidatas para secuenciación utilizando el criterio de cultivo en condición control, alta concentración de RNA, RIN>9 y relación de absorbancia A_{260}/A_{280} cercano a 2 (Apéndice **13.3B**). Las muestras seleccionadas finalmente fueron 3, con las que se preparó un *pool* de RNA total y se llevó a cabo la preparación de librería y la secuenciación. Los datos estadísticos obtenidos a partir de la secuenciación se presentan en la Tabla 2, en conjunto con los datos obtenidos desde el ensamblaje. Las secuencias de *contigs* consenso obtenidas desde el ensamblaje fueron anotadas según criterio ontológico (Figura 4), considerando proceso biológico, función molecular y componente celular. Al comparar por homología contra las secuencias de distintas especies de plantas y algas depositadas en NCBI, la mayor cantidad de hallazgos fue contra el alga roja *Chondrus crispus* (Figura 5) genoma depositado en la base de datos el 2013 (Collén, y otros, 2013). La identificación de los genes que codifican las proteínas *linker* se llevó a cabo mediante homología contra la base de datos de proteínas obtenidas desde Uniprot Knowledge Database, utilizándose un criterio de selección valor E y porcentaje de similitud. En la Tabla 3 se indican las proteínas linker identificadas por predicción, donde además se señala el *contig* contenedor de la secuencia. La Figura 13.4 (Apéndice) detalla las secuencias de transcritos de *linkers* identificados y utilizados subsiguientemente en la comparación de expresión bajo las distintas condiciones de aclimatación

Tabla 2: Resumen de datos obtenidos desde la secuenciación de la librería de *Gracilaria chilensis*.

Secuenciación	
Número de Lecturas (<i>Reads</i>)	52.778.220
Largo promedio de lectura (pb)	100,52
Ensamblaje <i>de novo</i>	
Número de <i>Contigs</i>	12.331
Largo promedio de <i>Contig</i> (pb)	1.756
N50*	3.770
Lecturas asignadas (<i>Matched reads</i>)	96,64%
*N50: Corresponde al largo del <i>Contig</i> de menor tamaño que se obtiene al ordenar los <i>Contigs</i> cuya suma de tamaños es igual a la mitad de la suma de los largos de todos los <i>Contigs</i> , ordenados de mayor a menor.	



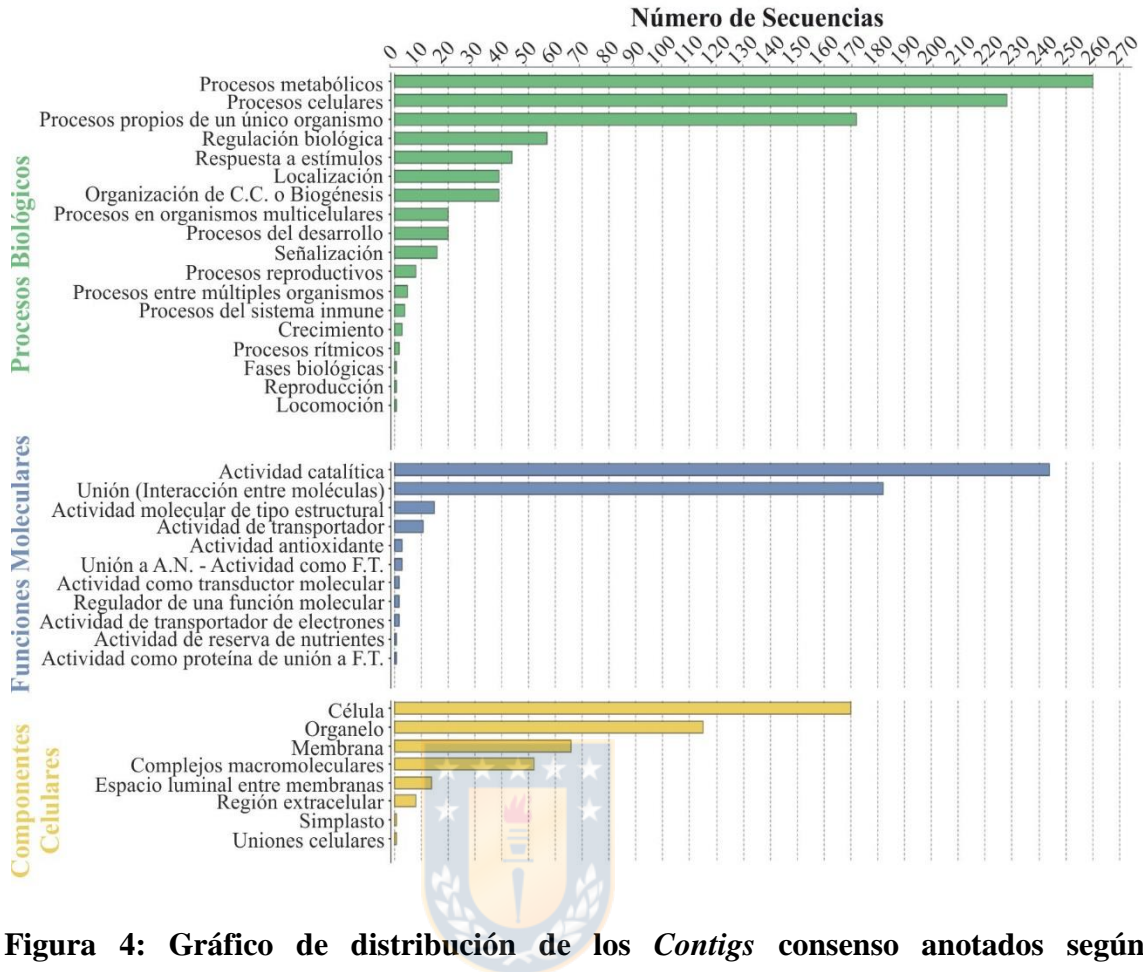


Figura 4: Gráfico de distribución de los *Contigs* consenso anotados según clasificaciones ontológicas sobre el RNA-seq de *Gracilaria chilensis*.

La anotación funcional se realizó sobre las secuencias consenso de los *Contigs* según los términos asignados para distintas clasificaciones ontológicas utilizando el programa BLAST2GO (Conesa, y otros, 2005). Se ordenan en el eje de las ordenadas las secuencias en orden decreciente según su número, considerando los criterios de Procesos Biológicos (barras en verde), Funciones Moleculares (barras en azul) y Componentes Celulares (barras en amarillo). C.C.: componentes celulares. A.N.: ácidos nucleicos. F.T.: factor de transcripción. Fuente: Modificada y traducida al español desde la obtenida del *software* de análisis genómico *CLC Genomic Workbench*.

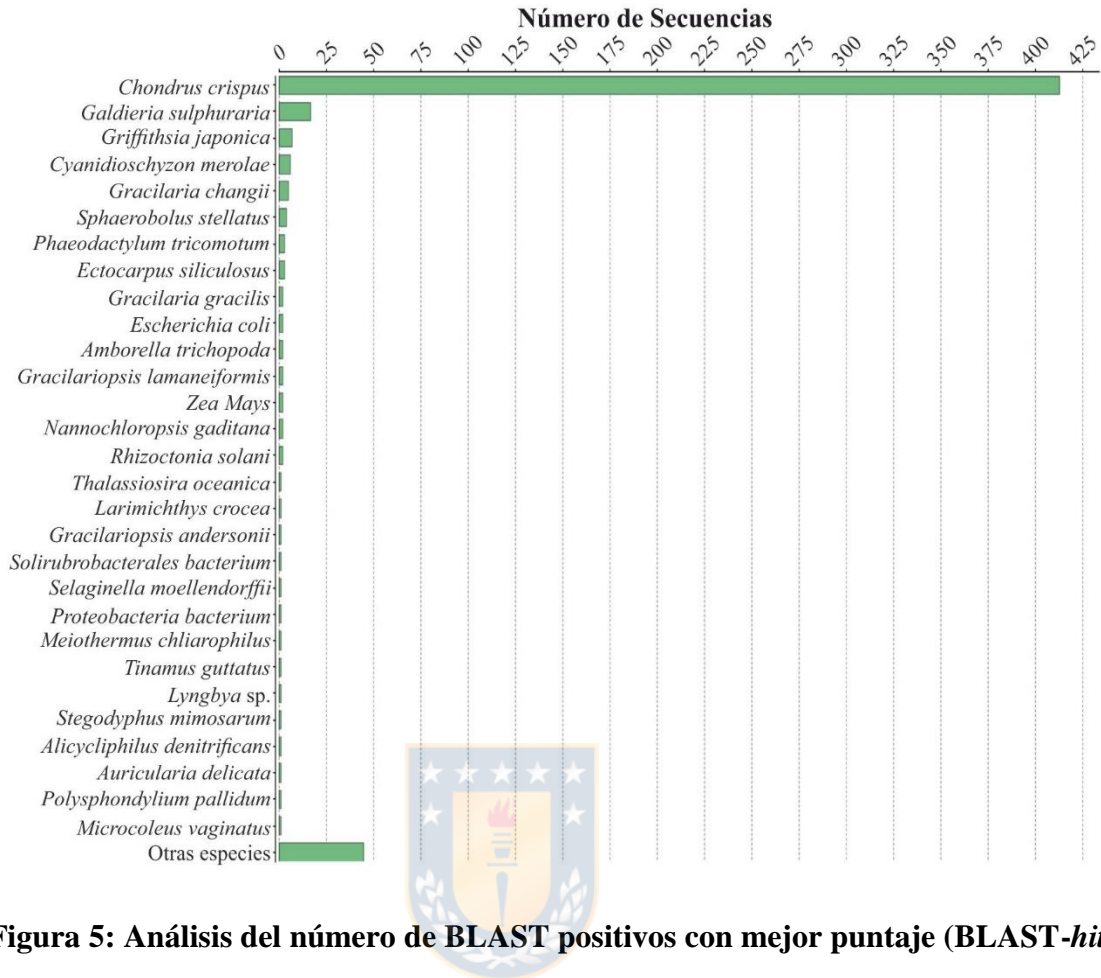


Figura 5: Análisis del número de BLAST positivos con mejor puntaje (BLAST-hits) al comparar las secuencias de los *Contigs* contra los genes de distintas especies de algas, plantas y cianobacterias.

La comparación por homología de los *Contigs* se realizó empleando el *software CLC Genomics Workbench* (v8.1, CLC Bio, Dinamarca), utilizando el algoritmo BLASTP ajustando el valor de corte (*E-value*) a $1 \times e^{-10}$, contra una base de datos de proteínas no redundante para algas depositada en NCBI *gene bank*. Fuente: Modificada y traducida al español desde la obtenida del *software* de análisis genómico *CLC Genomic Workbench*.

Tabla 3: Predicción de proteínas mediante homología de secuencia de los *Contigs* desde *Gracilaria chilensis*.

Proteína <i>linker</i>	ID referencia	Cobertura (%)	<i>E-value</i>	Identidad (%)	Predicción		Número del <i>Contig</i>
					MW (Da)	pI	
Dominio tipo							
<i>L_C/L_{CAP}</i>							
desde CpcD							
ApcC*	M2Y574*	75	8×e ⁻³⁵	54	13.217	10,16	2.239
CpcD**	M1UUN7**	79	5×e ⁻³³	66			
Polidominio							
<i>linker</i> del							
PBS tipo L _R C							
desde CpcG							
Q6B8M9		100	8×e ⁻¹⁶⁹	97	27.281	5,65	8.261 11.210
Polidominio							
<i>linker</i> del							
PBS tipo L _R							
CpeE*	A5HIW5*	59	1×e ⁻⁴¹	44	51.261	9,07	941
CpcC**	Q7NGF2**	63	4×e ⁻³⁸	50			
Polidominio							
<i>linker</i> del							
PBS tipo L _R							
desde CpeD							
A5HIW4		56	9×e ⁻⁴²	39	34.245	5,28	1.278
Polidominio							
<i>linker</i> del							
PBS tipo							
L _R /L _R C desde							
CpcD							
CpeC*	Q7NL63*	60	1×e ⁻⁴¹	43	38.103	9,41	975
Cpci**	C7DT11**	47	2×e ⁻³⁹	33			
CpcH***	Q44112***	46	6×e ⁻³⁸	32			
Dominio tipo							
globina del							
polidominio							
<i>linker</i> del							
PBS tipo L _{CM}							
desde ApcE							
AIA21292		100	0	68	98.882	8,97	N/D
Subunidad							
γ ³¹ de PE							
R7QDA3		72	7×e ⁻⁹⁵	52	30.576	9,47	4.366
Subunidad							
γ ³³ de PE							
R7Q9W8		81	6×e ⁻¹⁶⁵	73	34.884	9,5	902

LCM: Proteína *linker* core-membrana.
 LC: Proteína *linker* del core.
 LRC: Proteína *linker* de la varilla-core.
 LCAP: Proteína *linker* terminal (*Cap*).
 PBS: Ficobilisoma.
 PE: Ficoeritrina.

7.3 Objetivo específico 3

Cuantificar de forma relativa normalizada los niveles de expresión de los RNA mensajeros codificantes de las proteínas *linker* de *Gracilaria chilensis* aclimatada a los fotoperíodos en estudio.

7.3.1 Determinación de la estabilidad en la expresión de genes candidatos a genes de referencia en muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperíodos.

Para realizar la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés relacionados con genes que codifican para los péptidos linkers del ficobilisoma (Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF y ApcC) se requiere de la elección y validación de genes de referencias para la especie en estudio. Ni para nuestro modelo, ni para el orden Gracilariales, existen reportes de genes de referencia en un contexto de aclimatación a luz. Sin embargo, para el alga roja pluricelular *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyta) se definió un grupo de genes de referencia de expresión relativamente estables frente a diversas condiciones ambientales en cultivos *in vitro* o en muestras de vida libre. Las condiciones de cultivo variaron tanto la intensidad luminosa y/o concentración de NaCl, además de la exposición de cultivos a agentes estresores como el peróxido de hidrógeno, cationes divalentes, pesticidas y metil-jasmonato (Kowalczyk, Rousvoal, Hervé, Boyen, & Collén, 2014). A partir de este estudio seleccionamos un grupo de 11 genes candidatos (GAPDH, ACTA1, TUBA1, TUBA2, TUBB2B, eRF3, EF1- α , UBQ1, UBCE2, IF4A1, IF4A2) para los cuales diseñamos 2 set de partidores en base a la secuencia de los cDNA identificadas desde los *contigs* obtenidos desde el RNA-seq (data no mostrada). Se realizó qPCR empleando cDNAs obtenidos desde una muestra aclimatada a cada condición de fotoperíodo, en condiciones de amplificación comunes (ver Métodos). Luego, se seleccionaron los datos de amplificación del set de partidores de cada gen que no presentó amplificación de dímeros de partidores, o en su defecto, el que presentó la menor cantidad, los que se muestran en la figura 6. Desde este análisis, y en base a sus menor diferencias entre los valores de amplificación de las 3 muestras, seleccionamos los genes GAPDH, eRF3, ACTA1, IF4A2, TUBB2B y IF4A1 para analizar las todas las muestras.

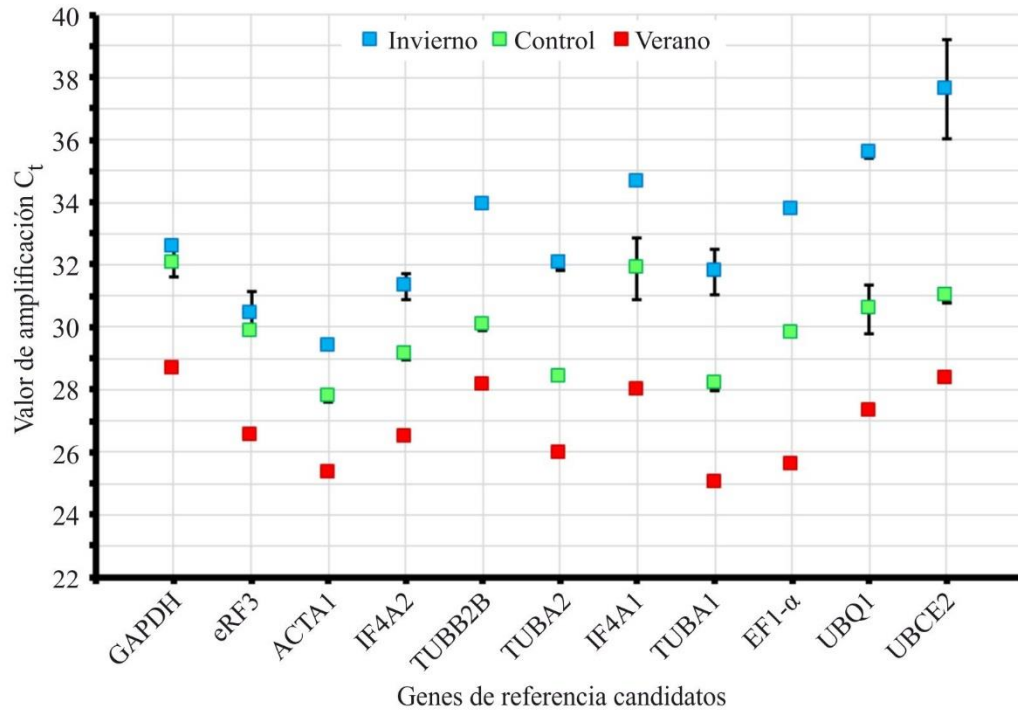


Figura 6: Valores del ciclo de amplificación umbral (C_t) para 11 genes candidatos a genes de referencia en las condiciones de aclimatación a los tres fotoperiodos analizados en *Gracilaria chilensis*.

Se determinaron mediante RT-qPCR los valores del ciclo de amplificación umbral (C_t , definido en materiales y métodos) para 11 genes candidatos a genes de referencia en 3 diferentes muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a una de las tres condiciones de fotoperiodos en estudio (verano, control e invierno). Los genes fueron seleccionados como los más estables entre los identificados desde el estudio en el alga roja *Chondrus crispus* (Kowalczyk, Rousvoal, Hervé, Boyen, & Collén, 2014). Los genes fueron ordenados de izquierda a derecha desde el que presenta menor al que presenta mayor diferencia entre los valores de amplificación para las condiciones de aclimatación. Cada determinación del valor de amplificación fue realizada por duplicado, indicándose con las barras de error la desviación estándar de cada medición. Fuente: Elaboración propia.

Lo primero que realizamos fue estandarizar las condiciones de amplificación de manera de alcanzar parámetros aceptables para cada uno de los genes de referencia

(Agilent Technologies, Inc., 2004; Udvardi, Czechowski, & Scheible, 2008). En la tabla 4 se observa que después de las estandarizaciones, no logramos conseguir una condición libre de dímeros de partidor para los genes GAPDH y IF4A2. Con esta información, realizamos la amplificación sobre todas las muestras incubadas en cada una de las 3 condiciones de fotoperíodo en estudio ($N = 30$) sólo para los genes eRF3, ACTA1, TUBB2B y IF4A1, resultados que muestran en la figura 7. Es evidente que los valores de amplificación para ACTA1 presenta la mayor dispersión entre los genes analizados. Sin embargo, mediante este análisis es imposible discernir cual presenta menor desviación entre los otros genes en estudio (eRF3, TUBB2B o IF4A1). Además, cabe indicar que una alta dispersión de los valores de amplificación no indicaría *per se* que la expresión del gen no es estable, ya que existe la posibilidad de un error de variabilidad en la técnica de medición (cuantificación del RNA total, diferencias en la eficiencia de síntesis de cDNA en cada reacción de transcripción reversa, entre otras).

Para determinar qué genes presentan una expresión estable en el modelo en estudio, se realizaron los siguientes análisis. El primero de ellos se muestra en la figura 8 y correspondió al cálculo del producto de los cocientes de los valores de amplificación de dos genes de referencia en dos muestras diferentes o error de normalización para un único gen de referencia (E) (Vandesompele, y otros, 2002). El gráfico de la frecuencia-acumulada del error E muestra que existe una proporcionalidad del error cercana al error sistemático (el mínimo error posible en las condiciones experimentales de este estudio) entre los datos obtenidos para los genes EF41A-eRF3 y para TUBB2B-ACTA1. La menor proporcionalidad en el error (o mayor diferencia entre las muestras) se observa al comparar los genes IF41A-TUBB2B y IF41A-ACTA1. De esta forma los datos indican que existen dos grupos de distribución en la expresión de los genes candidatos y que presentan poca correlación entre ellos. Aun así, estas diferencias son pequeñas, con un 80% de los valores de E menores que 2 (siendo $E = 1$ concordancia perfecta).

Tabla 4: Parámetros de amplificación mediante RT-qPCR de los pares de partidores contra los candidatos a genes de referencia y los genes de interés en *Gracilaria chilensis*.

Gen	Tamaño Producto de PCR (pb)	T _m (°C)	Eficiencia (%)	R ²	Producto inespecífico	T _m PI (°C) †
Genes de referencia						
GAPDH **	190	83,9	96,1	0,998	Sí	79,9
eRF3 *	200	87,3	99,7	0,999	No	---
ACTA1 **	198	86,3	101,4	0,999	No	---
IF4A2 **	162	87,2	96,4	0,999	Sí	80,8
TUBB2B **	178	88,3	103,4	0,999	No	---
IF4A1 *	179	86,0	99,1	0,999	No	---
Genes de interés						
Linker γ^{31} *	178	84,4	101,0	0,999	No	---
Linker γ^{33} *	186	87,3	103,0	0,999	No	---
ApcC *	158	83,7	103,1	0,999	No	---
ApcF *	140	75,3	101,2	0,998	No	---

(†) T_mPI: Tm del producto de amplificación inespecífico.

(*) Empleando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix (Agilent).

(**) Empleando el kit HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne).



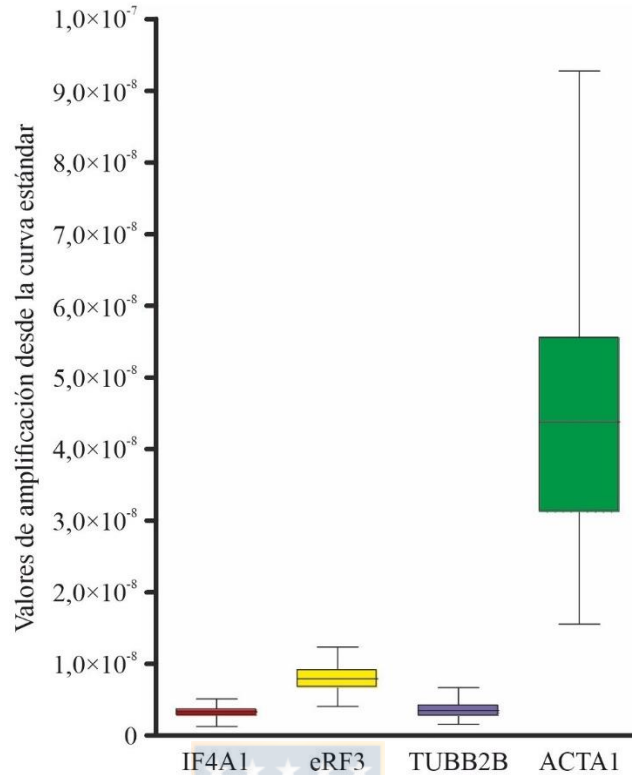


Figura 7: Valores de amplificación mediante RT-qPCR de los candidatos a genes de referencia sobre todas las muestras de los diferentes grupos de aclimatación a los fotoperiodos en *Gracilaria chilensis*.

Los valores de amplificación mediante RT-qPCR fueron obtenidos por el método de la curva estándar (descrito en métodos) por lo que corresponden a valores de dilución. Los datos son presentados como un gráfico de cajas y bigotes, donde se muestra la mediana y los valores extremos. Se incluyeron los valores de amplificación obtenidos para los genes IF4A1, eRF3, TUBB2B y ACTA1 desde todas las muestras pertenecientes a los tres grupos de aclimatación a los fotoperiodos de verano, control e invierno (N = 30). Fuente: Elaboración propia.

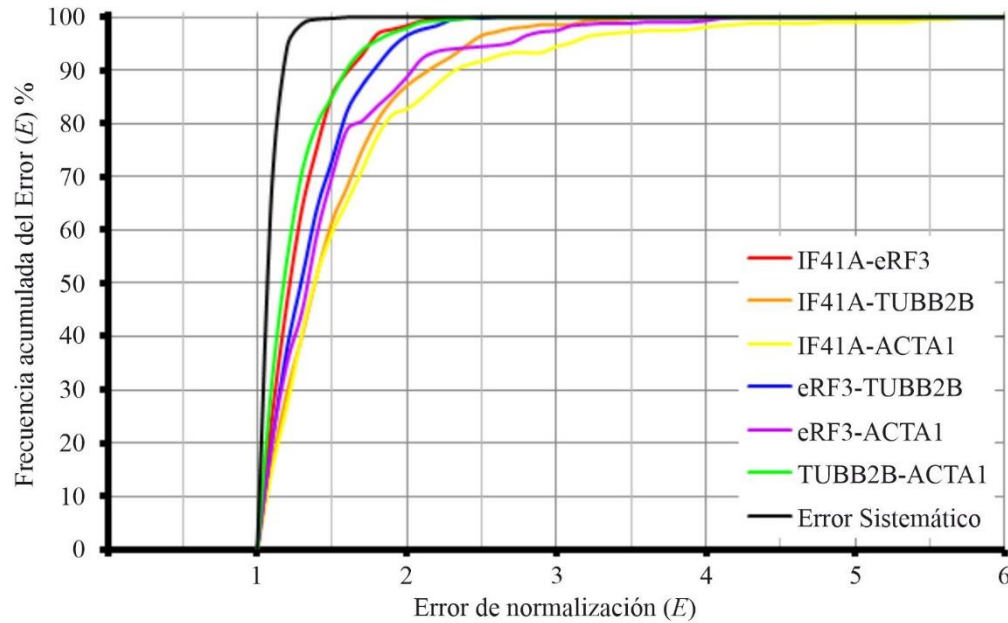


Figura 8: Gráfico de la frecuencia acumulada porcentual (%) del error de normalización para un único gen de referencia (E) en *Gracilaria chilensis*.

El error fue calculado como el producto de los cuocientes de los valores de amplificación de dos genes de referencia en dos muestras diferentes (Vandesompele, y otros, 2002). El gráfico muestra la comparación entre los genes de referencia IF41A, eRF3, TUBB2B, ACTA1 determinados mediante RT-qPCR en los 3 grupos de aclimatación a los fotoperiodos de verano, control e invierno de *Gracilaria chilensis* ($N = 30$). Para un set de genes de referencia cuya expresión sea constante entre las diferentes muestras, el error de normalización $E = 1$. Valores de $E > 1$ indican las veces de diferencia entre los genes de referencia para las muestras. La línea negra indica el error sistemático promedio entre dos replicas realizadas para el mismo gen de referencia en dos muestras diferentes. Fuente: Elaboración propia.

De forma de validar la existencia de estos dos grupos, graficamos los valores de expresión transformados en gráficos de dispersión para cada combinación de genes candidatos a genes de referencia (figura 9). En cada panel se informa el coeficiente de determinación (coeficiente de Pearson al cuadrado, R^2). A partir de éste valor es claro que el par de genes que se ajusta mejor a una recta obtenida por el método de los mínimos cuadrados (relación lineal) es TUBB2B-ACTA1 (76% de los valores de expresión de cada gen en la misma muestra). El grupo conformado por EF4A1-eRF3 muestran una relación lineal considerablemente menor (47%), quedando por debajo incluso del par conformado por eRF3-TUBB2B (50%).

Debido a que los análisis anteriores no permiten definir cuál grupo describe de mejor manera un comportamiento estable en términos de expresión global de genes, decidimos emplear dos algoritmos diferentes que permiten calcular un valor de estabilidad de la expresión (explicado en detalle en Métodos). En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos empleando el programa NormFinder y geNorm, y que coinciden al calificar al gen TUBB2B como el más estable. Sin embargo, ACTA1 es indicado como el menos estable por el software NormFinder, a pesar de que TUBB2B-ACTA1 conforman un mismo grupo en el análisis del error de normalización, mientras que geNorm sitúa en ese lugar al gen IF4A1. Es importante hacer notar que ninguno de los dos análisis sitúa al gen eRF3 como el menos estable. Nos pareció importante buscar una tercera metodología que permitiera dirimir el orden de estabilidad de expresión sobre el resto de los genes.

Decidimos realizar un gráfico de Bland-Altman, el cual describe la concordancia entre dos mediciones cuantitativas. En la figura 11 se observa que ACTA1 presenta una diferencia (error) proporcional constante al compararse contra los otros tres genes en estudio (R^2 : IF4A1-ACTA1 = 0,99; eRF3-ACTA1 = 0,98; TUBB2B-ACTA1 = 0,99)

Desde este mismo análisis se observa un error proporcional constante entre los genes eRF3 e IF4A1, aunque en menor medida al observado anteriormente ($R^2 = 0,58$). Sin embargo, al analizar TUBB2B contra eRF3 o contra IF4A1 se observa que existen diferencias aleatorias a lo largo del rango analizado dentro del intervalo de confianza del 95% ($\pm 1,96s$) consistente con una distribución aleatoria del error (R^2 : IF4A1-TUBB2B = 0,22; eRF3-TUBB2B = 0,17). Así, es posible descartar el gen ACTA1 dentro de los genes candidatos a genes de referencia y debido a que los dos análisis mostrados en la figura 10 coinciden en el orden general de estabilidad, los genes de referencia quedan ordenados de mayor a menor estabilidad como sigue: TUBB2B, eRF3 e IF41A.



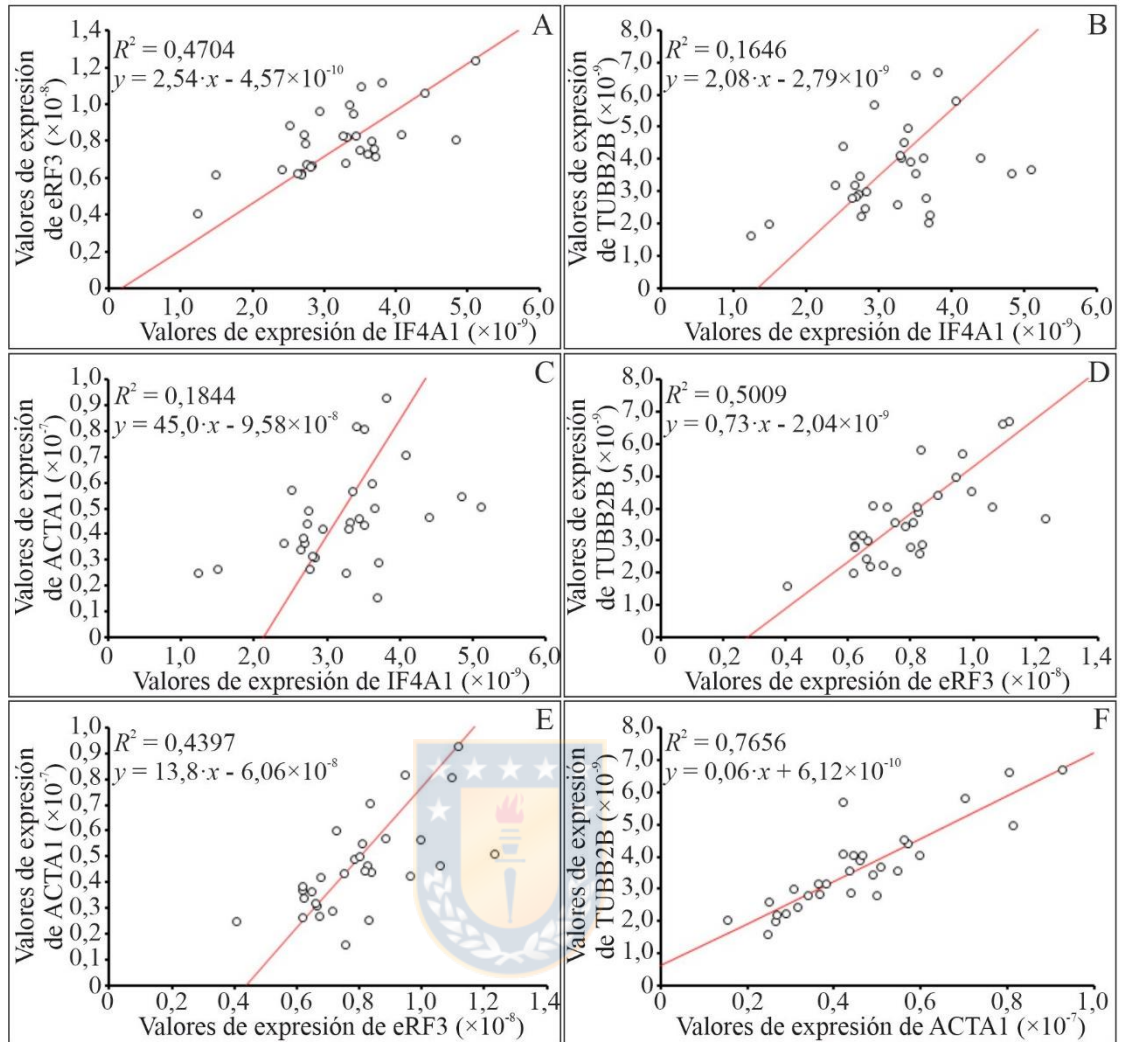


Figura 9: Gráficos de dispersión comparando los valores de expresión obtenidos para cada par de candidatos a genes de referencia para muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperiodos.

Se muestran los gráficos de dispersión de los valores de expresión de cada par de genes de referencias candidatos en estudio (IF4A1, eRF3, TUBB2B, ACTA1). Los valores de expresión corresponden a todos los obtenidos mediante RT-qPCR para cada gen de referencia, e interpolados desde la curva estándar, sobre todas las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a los fotoperiodos de verano, control e invierno (N = 30). La línea roja corresponde a la regresión de Passing-Bablok (Passing & Bablok, 1983) de los datos, indicándose además la ecuación de la recta obtenida mediante este método. Se muestra el valor de correlación de Pearson al cuadrado (R^2) de cada set de datos. Fuente: Elaboración propia.

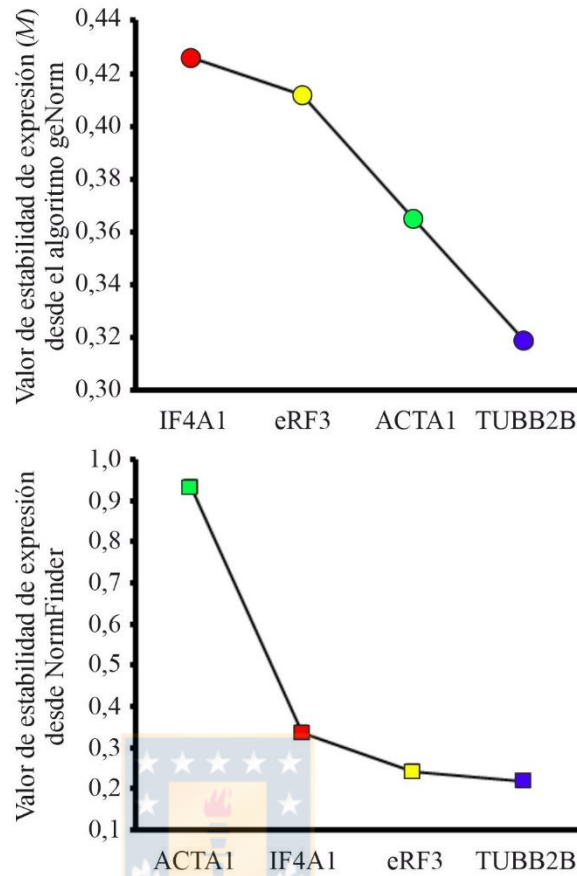


Figura 10: Análisis de la estabilidad de expresión para los candidatos a genes de referencia en muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperiodos.

Los valores de estabilidad de expresión fueron calculados para los 4 candidatos a genes de referencia (IF4A1, eRF3, TUBB2B, ACTA1) sobre todas las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a los fotoperiodos de verano, control e invierno (N = 30). Los valores de amplificación obtenidos para cada gen fueron analizados usando el algoritmo geNorm (Vandesompele, y otros, 2002) y por el programa NormFinder (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004). Los valores de estabilidad de expresión fueron ordenados desde el gen de menor al gen de mayor estabilidad (mayor a menor valor, respectivamente). Fuente: Elaboración propia.

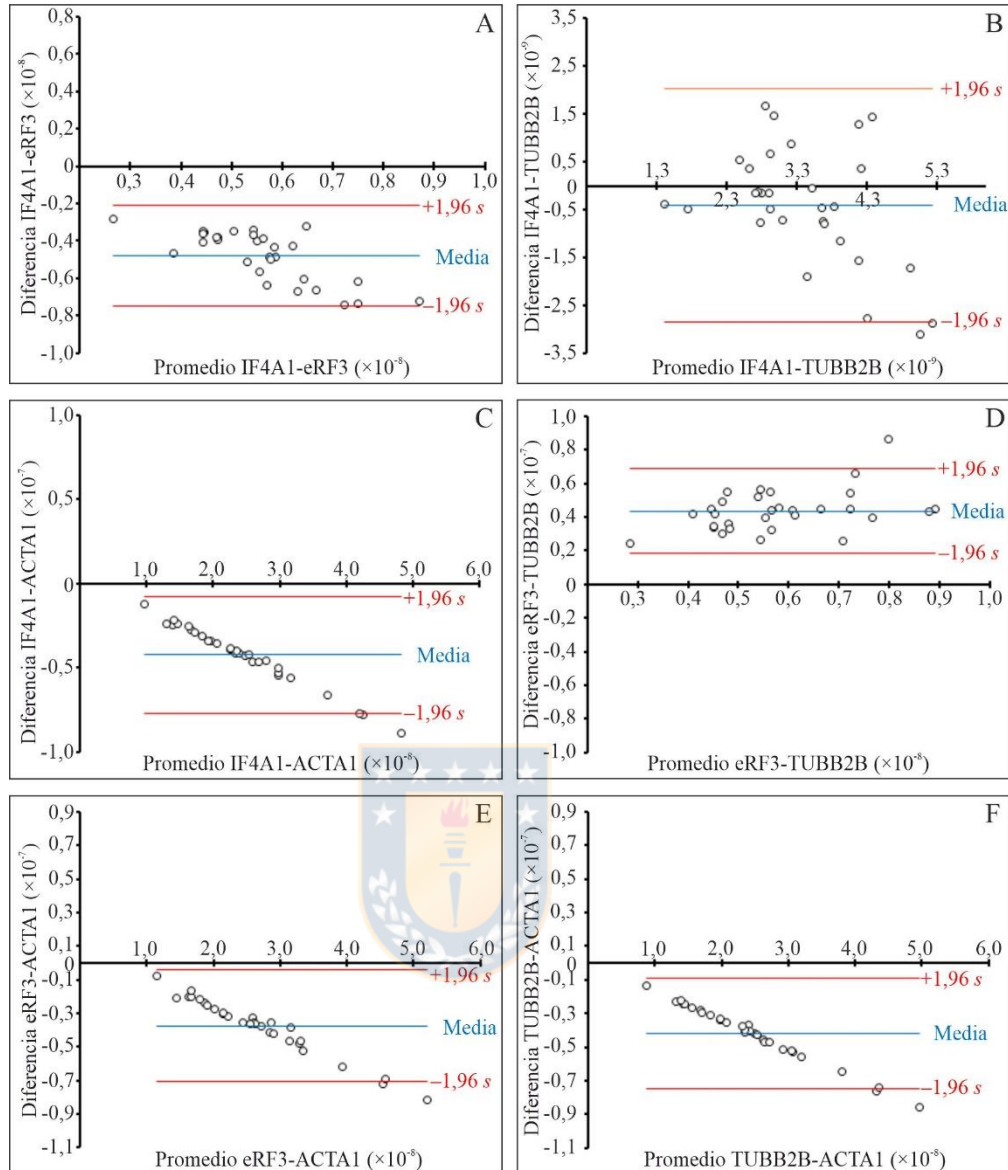


Figura 11: Gráficos de Bland-Altman comparando los valores de expresión obtenidos para cada par de candidatos a genes de referencia para muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperiodos.

Se graficó la diferencia versus el promedio de las mediciones del valor de expresión de cada par de candidatos a genes de referencias en estudio (IF4A1, eRF3, TUBB2B, ACTA1). Los valores de expresión corresponden a todos los obtenidos mediante RT-qPCR para cada gen de referencia, e interpolados desde la curva estándar, sobre todas las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a los fotoperiodos de verano, control e invierno (N = 30). La línea azul corresponde al promedio de las diferencias entre los valores de expresión y las líneas rojas a los límites del error definidos como 1,96 veces la desviación estándar (s) para los promedios de las diferencias. Fuente: Elaboración propia.

Con los resultados antes expuestos, la decisión más sencilla sería normalizar los valores de expresión de los genes de interés respecto del gen TUBB2B, debido a que corresponde al gen de mayor estabilidad. No obstante, desde el análisis de frecuencia acumulada del error E (figura 8) se deduce que eRF3-IF4A1 conforman un grupo común distinto al conformado por ACTA1-TUBB2B, por lo tanto, una normalización realizada sólo respecto de TUBB2B no representaría un normalizador global de la expresión de los genes en estudio. Ha sido propuesto el uso de más de un gen de referencia para la cuantificación relativa en ensayos de RT-qPCR (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004; Vandesompele, y otros, 2002). Para determinar cuantitativamente el efecto (positivo o negativo) del uso de más de un gen de referencia se ha descrito el uso del valor de variación por pares (V) que se obtiene desde el análisis de estabilidad empleando el algoritmo geNorm (Vandesompele, y otros, 2002). Básicamente, se calcula el factor de normalización (NF) para el gen de mayor estabilidad (TUBB2B) y luego el factor de normalización combinado (media geométrica) de los dos genes más estables (TUBB2B y eRF3) y luego para los tres más estables (TUBB2B, eRF3 y IF4A1). La desviación estándar obtenida sobre el promedio de todos los factores de normalización para cada muestra ($N = 30$) corresponde al valor de variación por pares del grupo ($V_{n/n+1}$). El número de genes de referencias necesarios para la correcta normalización es aquel con el cual se obtiene un valor V mayor o igual a 0,15. En la figura 12 se muestran los gráficos de dispersión obtenidos entre los NF para uno o más genes de referencia. Ya que el valor $V_{1/2}$ es de 0,176 ($V_{1/2} > 0,15$) y debido a que el valor $V_{2/3}$ es de 0,115 ($V_{2/3} < 0,15 < V_{1/2}$) es evidente que se requiere el uso del factor de normalización combinado de TUBB2B-eRF3 en la cuantificación relativa de los genes de interés para *Gracilaria chilensis* bajo las diferentes condiciones de fotoperíodo en estudio.

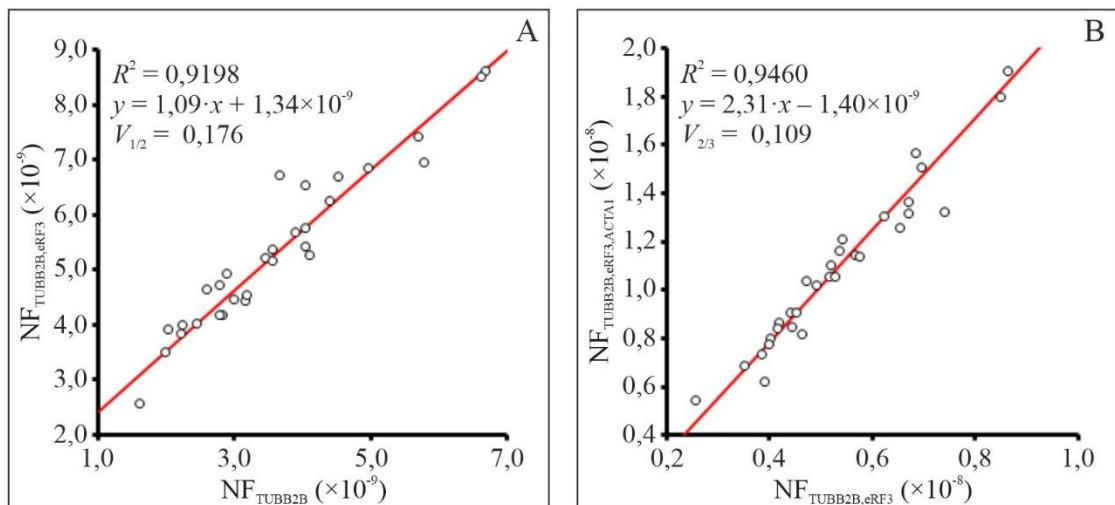


Figura 12: Gráficos de dispersión comparando los factores de normalización (NF) obtenidos para cada set de candidatos a genes de referencia para muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperiodos.

Los factores de normalización (NF) fueron calculados según (Vandesompele, y otros, 2002) para cada set de genes de referencia en estudio, agrupados en orden decreciente según su estabilidad (TUBB2B, eRF3, ACTA1 e IF4A1). Los factores de normalización fueron calculados a partir de los valores de expresión obtenidos mediante RT-qPCR para cada gen de referencia, e interpolados desde la curva estándar, sobre todas las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a los fotoperiodos de verano, control e invierno (N = 30). La línea roja corresponde a la regresión de Passing-Bablok (Passing & Bablok, 1983) de los datos, indicándose además la ecuación de la recta obtenida mediante este método. Se muestra el valor de correlación de Pearson al cuadrado (R^2) de cada set de datos y el valor de variación por pares (V) para cada set de genes de referencias en estudio. Fuente: Elaboración propia.

7.3.2 Cuantificación relativa de la expresión de los genes que codifican para las proteínas Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF y ApcC en muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperíodos.

De igual forma que para los genes de referencia, se determinaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF y ApcC desde las muestras de *G. chilensis* aclimatadas a los fotoperíodos control, verano e invierno. Tras una estandarización de las condiciones de amplificación, se obtuvieron parámetros de amplificación aceptables para realizar la cuantificación relativa (Tabla 4), normalizando por la media geométrica de los genes de referencia TUBB2B y eRF3. En la figura 13 se muestra la cuantificación relativa de cada gen de interés, observándose un aumento estadísticamente significativo de todos ellos en la condición de aclimatación a invierno (8/16) respecto de la condición control (12/12). El mayor aumento se observa para el gen ApcC (2,2 veces el promedio del control, figura 13D), seguido del Linker γ^{33} (1,8 veces del promedio, figura 13B) y finalizando con los genes ApcF y Linker γ^{31} (con 1,5 y 1,4 veces el promedio, figuras 13C y 13A, respectivamente). Por otro lado, sólo se observó un aumento significativo en el gen Linker γ^{33} en la condición de aclimatación al fotoperíodo de verano (16/8) respecto de la condición control (1,6 veces el promedio, figura 13B). Es necesario destacar el aumento de la expresión del gen ApcC en la condición de aclimatación al fotoperíodo de verano (16/8) respecto del invierno (0,8 veces el promedio, figura 13D) aunque no es estadísticamente significativo. Sin embargo, ya que no existe diferencia significativa entre los valores de expresión relativa ApcC en las condiciones de verano y control, es probable que el aumento de la expresión en la condición de invierno sea verdadero, requiriéndose un mayor número de individuos al usado en este estudio ($N > 10$).

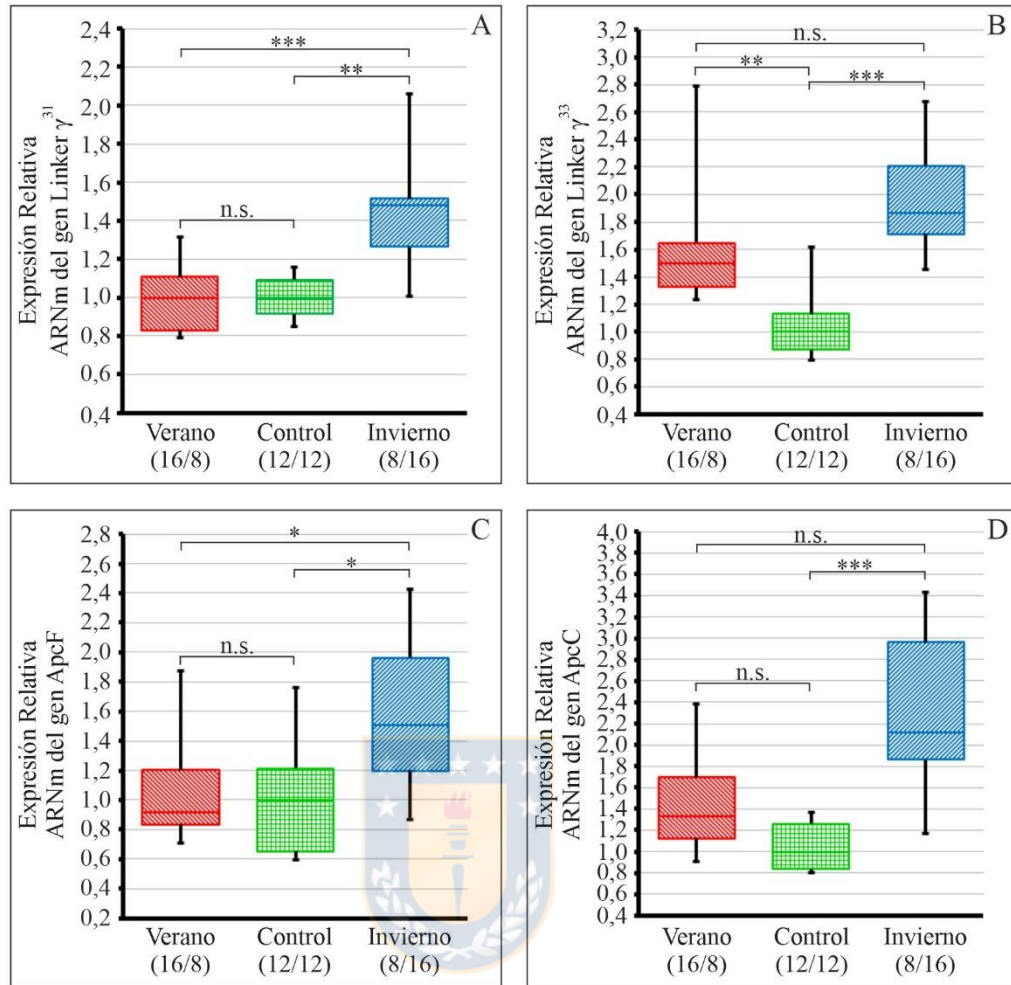


Figura 13: Expresión relativa normalizada de los ARNm de los genes Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF y ApcC en las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a diferentes fotoperiodos.

Gráficos de cajas que muestran los valores de expresión relativa de los ARNm de los genes que codifican para los péptidos linkers del ficobilisoma (Linker γ^{31} , Linker γ^{33} , ApcF y ApcC) desde las muestras de *Gracilaria chilensis* aclimatadas a los fotoperiodos de verano, control e invierno (horas de luz/horas de oscuridad). Los valores de expresión de cada gen de interés fueron determinados mediante RT-qPCR y fueron normalizados respecto del factor de normalización (NF_{TUBB2B} , e_{RF3}) correspondiente a la media

geométrica para los valores de expresión de los ARNm de los genes de referencia TUBB2B y eRF3. Los datos normalizados son presentados como veces sobre la mediana del grupo control. Las cajas indican los rangos intercuartiles 2 y 3, separados por la mediana, igual a 1 para el grupo control ($N_{\text{grupo}} = 10$). Las barras de error corresponden a los valores máximos y mínimos de cada grupo. Las medianas de los valores de expresión normalizados fueron analizadas mediante una prueba Kruskal-Wallis acompañado de una prueba de Dunn post-hoc, estimándose desde este último el valor de probabilidad (n.s.: no significativo; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). Fuente: Elaboración propia.



8 Discusión

Gracilaria chilensis pertenece a un género de algas que se caracteriza por habitar nichos ampliamente distribuidos, tanto a nivel geográfico como intermareal. Se han observado en especies de algas y cianobacterias que esta plasticidad es posible por un conjunto de mecanismos que llevan a respuestas de aclimatación, ya sea a condiciones de nutrientes o de irradiancia. Estudios preliminares en nuestro laboratorio sugieren que variaciones en la irradiancia producto de la transición estacional podría provocar cambios a nivel de complejos auxiliares recolectores de luz, los ficobilisomas (Bruna Jofré, 2001), sin embargo, no se ha profundizado respecto a qué proteínas que componen de este complejo se verían alteradas. Esta tesis plantea estudiar los cambios transcripcionales de proteínas linkers de ficobilisomas frente a transiciones estacionales de fotoperíodo, considerando que serían las responsables de mantener la estabilidad estructural a nivel de complejo y su asociación a la membrana tilacoidal.

Para estudiar estos cambios transcripcionales, el diseño experimental contempló la aclimatación a períodos de luz y oscuridad similares a las estaciones en estudio (16L/8O para verano y 16O/8L para invierno), incubándose los cultivos bajo estas condiciones durante una escala de tiempo definida como “a largo plazo” (*long term*); este intervalo de tiempo considera cambios que pueden producirse a partir de días y corresponde al tiempo en el que se producen respuestas y rearrreglos producto de variaciones a nivel transcripcional y síntesis de proteínas (Fujita, Murakami, Aizawa, & Ohki, 1994; Lars Dietzel, 2008). Para evitar una posible fotoinhibición durante la incubación, los cultivos se sometieron a $60 \mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y el seguimiento de la aclimatación a las condiciones de cultivo se llevó a cabo mediante la determinación de fluorescencia de clorofila a. Al inicio del período de aclimatación del cultivo *in vitro*, observamos que la eficiencia fotosintética F_v/F_m de los distintos individuos en estudio fue similar, lo que nos indicaría que a pesar de sus diferentes *background* genéticos mostrarían una respuesta metabólica energética similar. Sin embargo, al día 4 *in vitro* bajo el fotoperíodo de aclimatación 12O/12L, se observó una alta dispersión de la eficiencia fotosintética, infiriendo a partir de esto que las condiciones de cultivo *in vitro* provocaron una disminución en el transporte de electrones efectivo en cerca de un 25% de los individuos

(Figura 3; día 4). A pesar de esto, y debido a que el cultivo *in vitro* del alga por más de 16 días mostró un evidente deterioro de los especímenes en base a sus características macroscópicas (datos no mostrados obtenidos desde un ensayo preliminar empleando 10 individuos a un tiempo final de cultivo de 20 días a un fotoperíodo de 12O/12L), decidimos al cuarto día de cultivo *in vitro* separar de forma aleatoria a los 30 individuos en 3 grupos de estudio, correspondientes a los grupos control (12O/12L), invierno (16O/8L) y verano (8O/16L).

La siguiente medición de eficiencia fotosintética fue realizada al cuarto día de exposición a los distintos fotoperíodos (día 8 de cultivo *in vitro*), observándose una recuperación en la eficiencia del transporte de electrones en las condiciones de fotoperíodo de invierno y control a los rangos observados en las muestras en las determinaciones iniciales. En cambio, en las muestras sometidas al fotoperíodo de verano no se observó esta recuperación. Más aún, se observó un leve descenso de eficiencia fotosintética respecto a las determinaciones al inicio de los cultivos (Figura 3; día 8). Estos resultados coinciden con lo reportado por Iwasaki para *Porphyra tenera* (Rodophyta), en ensayos de aclimatación a distintos fotoperíodos, en los que se observó una disminución de actividad fotosintética en cultivos sometidos a fotoperíodos superiores a las 10 horas de luz durante 3 días (Iwasaki, 1965), lo que sugiere que la exposición a fotoperíodos prolongados podría tener el efecto saturante en el transporte de electrones de modo similar a la exposición a irradiancias de altas intensidades (Kinoshita & Teramoto, 1958).

Si bien la eficiencia fotosintética obtenida desde el inicio fue relativamente baja en comparación a lo reportado en literatura (0,832 para especies C3) (Demmig & Björkman, 1987), ésta se mantiene dentro de un rango para las tres condiciones experimentales sugiriendo que el cambio de la condición desde el ambiente natural al cultivo *in vitro* indujo cierto nivel de estrés sobre los cultivos. Sin embargo, no observamos cambios macroscópicos relevantes que denotaran deterioro de los cultivos, manteniendo la turgencia y su coloración, los que se pierden frente a condiciones de mayor estrés en individuos adultos (como los empleados en nuestro estudio) en respuesta a la falta de nutrientes o a condiciones inadecuadas de irradiancia (Dixon & Richardson, 1970).

Ahora bien, el modelo experimental empleado en esta tesis contempló condiciones constantes de temperatura (dato obtenido desde las condiciones ambientales del sitio de recolección, correspondiente a 17°C medidos en el agua de mar) y el uso del medio enriquecido PES (Provasoli) para su crecimiento y que fueron concordantes con las descritas por Iwasaki como aquellas que favorecen la viabilidad de los cultivos *in vitro*. Sin embargo, los estudios de Iwasaki también mostraron que cultivos expuestos a tubos fluorescentes como fuente luminosa eran una condición desfavorable para el crecimiento de *Phorphyra tenera* (actual *Pyropia tenera*), observando inviabilidad en períodos mayores a 9 días *in vitro*. No obstante, si bien empleamos iluminación con tubos fluorescentes, en nuestro modelo experimental los cultivos fueron sometidos a 4.400 lx (equivalente a 60 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), que corresponde a la mitad de la intensidad empleado por Iwasaki (Iwasaki, 1965). Esto sugiere que la inviabilidad reportada puede ser revertida al emplear una menor intensidad de luz, junto al uso del medio enriquecido PES (datos preliminares no mostrados comparando contra agua de mar filtrada). La fuente luminosa es un factor importante, ya que se ha reportado para *Gracilaria foliifera* una radiación saturante (obtenida en función del contenido de nitrógeno total a lo largo de un año de cultivo bajo estacionalidad natural) de aproximadamente 200 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz solar (Rosenberg & Ramus, 1982), casi el doble que la radiación saturante de luz fluorescente informada por Iwasaki.

Al continuar el crecimiento desde el día 12 de cultivo *in vitro* en adelante, y a diferencia de lo indicado arriba, las muestras pertenecientes a las tres condiciones de fotoperíodo presentaron eficiencias fotosintéticas similares (Figura 3; días 12 y 16). Esto sugiere que a este tiempo los cultivos *in vitro* alcanzaron niveles similares de aclimatación en respuesta a las tres condiciones de luz, lo que es sumamente relevante dado que el día 12 de cultivo *in vitro* se procedió a la extracción del RNA total para los ensayos de RT-PCR de la condición control. Así, los cambios que observamos en los niveles de expresión en los genes de interés no fueron producto de pérdida de la viabilidad de en los cultivos, si no más bien respuestas a los diferentes fotoperíodos, motivo por el que se continuó con el cultivo a un tiempo final de 16 días, corroborando así la estabilidad del parámetro observado Fv/Fm. Este período de fotoaclimatación (entre 12 a 16 días) coincide con el

período de aclimatación de 14 días informado previamente para *Gracilaria foliifera* (Rhodophyta) (Rosenberg & Ramus, 1982).

Antes de realizar el análisis de los niveles de expresión de los genes de interés buscamos las secuencias codificantes para cada uno de estos genes, y para algunos genes de referencia ampliamente descritos en literatura, desde las librerías de EST (*Expressed Sequence Tag*) existentes para diversas especies Gracilariales (Reddy, Gupta, & Jha, 2010; Collén, y otros, 2012). Desde este análisis sólo se encontraron fragmentos de las secuencias para algunos candidatos a genes de referencia (GAPDH, ACTB, TUBB), no encontrando ningún clon que correspondiera a alguno de los genes que codifican para proteínas *linker*. Sumado a esto, y debido a nuestra experiencia previa clonando algunos genes desde *G. chilensis* en base a las secuencias de nucleótidos obtenidos desde otras especies, sabíamos que el diseño de partidores en base a secuencias de nucleótidos de otras Rhodophyta en muchas ocasiones no generaría resultados positivos de amplificación (baja eficiencia, productos inespecíficos, ausencia de amplificación), incluso si eran diseñados en las regiones que codifican regiones altamente conservadas a nivel de la secuencia proteica. Esto último concuerda con la amplia evidencia experimental que indica la gran divergencia en los genomas de algas, incluso dentro de especies del mismo género (Santelices & Varela, 1993)

Casi en paralelo a los ensayos preliminares del cultivo *in vitro* de *G. chilensis*, fueron publicados los genomas para dos especies de algas rojas macroscópicas (*Pyropia yezoensis* y *Chondrus crispus*), obtenidos mediante secuenciación masiva (Collén, y otros, 2013; Nakamura, y otros, 2013). De igual forma, nosotros decidimos obtener un transcriptoma de referencia mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) para *G. chilensis*, el cual nos entregaría las secuencias de los genes en estudio sobre los cuales diseñaríamos los partidores para su detección mediante RT-qPCR sobre las muestras aclimatadas a los distintos fotoperíodos.

Los ensayos de RNA-seq fueron realizados sobre muestras de *G. chilensis* de vida libre obtenidas durante primavera (octubre), período estacional en el cual habíamos detectado previamente la expresión de los diferentes péptidos *linker* mediante análisis de SDS-PAGE de ficobilisomas enriquecidos (datos no mostrados). Estos especímenes (N=15) fueron aclimatados a las condiciones de cultivo *in vitro* durante 4 días en un

fotoperíodo de 12L/12O, similar al existente en la fecha de recolección. De esta forma, esperábamos lograr una disminución tanto en la carga de epifitos, como del grado de estrés sobre los cultivo. Sin embargo, y a la luz de los resultados de eficiencia fotosintética realizados con posterioridad a la secuenciación, se hubiese requerido un período de cultivo *in vitro* de al menos 8 días para lograr el segundo objetivo. Más aún, de las 15 muestras iniciales, sólo desde tres de ellas logramos obtener muestras de RNA total con una calidad (RIN > 8 y un alto enriquecimiento de mensajeros) necesaria para la secuenciación, y que podría reflejar un cierto nivel de daño producto del estrés en las muestras. La secuenciación de mensajeros totales fue realizada sobre un *pool* de estas 3 muestras, optándose por la alternativa *paired end*, dado que era imperativo obtener la mejor cobertura posible proyectando optimizar el ensamblaje de la secuencia, y, considerando además la complejidad del escenario posible con los antecedentes de literatura de divergencia de secuencias con otros organismos contra los que se esperaba llevar a cabo la anotación (Xiangyu, Song, Fangqing, Xiaowen, & Xuexi, 2007); de este modo disminuía la probabilidad de tener señal espurea en los extremos secuenciados (desde el extremo 3' o 5') que se tradujese a datos confusos de secuencia, esperando así contar con más información para aumentar la completitud de datos y tener la secuenciación extendida hasta el siguiente extremo (Ravi, Walton, & Khosrohedari, 2018).

A partir de la secuenciación y ensamblaje *de novo* se obtuvieron 12.331 *contigs* al compararse por homología mediante BLAST contra la base de datos depositada en NCBI. De ellos, el 96,64% fue asignado exitosamente, de los cuales 5.270 *contigs* se asociaron a proteínas con función fotosintética (datos almacenados en la base de datos ENA). Al llevarse a cabo la anotación funcional según clasificación ontológica se encontró que la mayor parte de los *contigs* correspondía a proteínas relacionadas con procesos metabólicos, celulares y propios de un único organismo, mientras que la clasificación según función molecular identificó principalmente proteínas con actividad catalítica y unión (interacción entre moléculas). Finalmente, la anotación según el criterio de componente celular arrojó una mayor representación para célula, organelo, membrana y complejos macromoleculares (Figura 4).

Como se indicó arriba, a la fecha, la mayor cantidad de información obtenida en relación con las secuencias codificantes para el género *Gracilaria* ha sido a partir de EST

(Ragan, Lluisma, & Mark, 1997; Teo, y otros, 2007; Collén, y otros, 2012). Pero al no estar anotados, su utilidad en la identificación de genes es escasa. Particularmente, y debido a su cercanía filogenética, el análisis de los *contigs* consenso que obtuvimos para *Gracilaria chilensis* podría hacerse respecto de la base de EST obtenido para la especie *Gracilaria tenuistipitata* (Ng, y otros, 2017). Sin embargo, el largo (de entre 700 a 850 pares de bases) y número de secuencias (2.387) presentes en esta librería limitan su utilidad al compararla con el largo promedio (1.750 pb) y número de *contigs* ensamblados (12.300) obtenidos desde nuestro RNA-seq (Collén, y otros, 2012). Realizamos entonces una anotación y comparación por homología de secuencias utilizando la *pipeline* del *software* CLC Genomic Workbench. Este análisis identificó que la especie con mayor número de secuencias homólogas correspondía al alga roja *Chondrus crispus*, la cual a pesar de su distancia filogenética respecto de *Gracilaria tenuistipitata*, posee mayor cantidad de información depositada en bases de datos asociadas (Figura 5). De esta forma, el gran número de secuencias anotadas de *Chondrus crispus* sobrepasa el efecto de su divergencia con *G. chilensis* para el análisis de los transcritos a nivel de proteínas traducidas. Inesperadamente, nuestro análisis no asignó ninguno de los *contigs* a las proteínas *linker*, y más extraño aún, a ninguna de las subunidades de las ficobiliproteínas. Esto pudo deberse a la ausencia dentro de las bases de datos asociada al programa de estas secuencias, aunque esto parece poco probable considerando que *Chondrus crispus* es un alga roja para la cual los genes de las proteínas estructurales de los PBS son característicos.

Debido a lo anterior, decidimos realizar una curación manual empleando tBLASTx (versión *standalone* en LINUX) sobre una base de datos correspondiente a todas las proteínas para *Chondrus crispus* presentes en UNIPROT (EMBL) contra los *contigs* previamente ensamblados. Este análisis permitió identificar las proteínas *linker* estudiadas previamente en nuestro laboratorio (LCM, γ^{31} y γ^{33}), además de las proteínas *linker* CpcG, CpeE, CpeD, CpeC, CpeI, CpcH (Tabla 2). De igual forma, el análisis asignó a un mismo *contig* los genes codificantes para las proteínas *linker* CpcD y ApcC, discrepancia que fue resuelta recientemente gracias al estudio de criomicroscopía electrónica de partícula única de los componentes del PBS de *Griffithsia pacifica*, para la cual se determinó que la secuencia correspondía efectivamente al gen ApcC y que codifica para el *linker* del *core* (LC) (Zhang, y otros, 2017).

La relevancia del estudio de la expresión de los genes que codifican para las proteínas *linker* radica en la dificultad de su estudio a nivel de proteínas (purificación y caracterización) y a que cambios en sus niveles podrían aportar información adicional a las estructuras ya resueltas y contribuir al entendimiento del ensamblaje del ficobilisoma bajo distintas condiciones fisiológicas. Además, y considerando el valor comercial productivo de *Gracilaria chilensis*, la caracterización bajo estas condiciones tanto de las enzimas relacionadas con diferentes procesos metabólicos, así como sus niveles de expresión se presenta como una plataforma potencial para aplicaciones biotecnológicas.

Una de las hipótesis de nuestro grupo de investigación sostiene que las proteínas *linker* serían las responsables de mantener la estabilidad estructural, o al menos de mediar en la flexibilidad, de las varillas de PBS frente a cambios ambientales, como por ejemplo el fotoperíodo. Bajo esta premisa, y considerando que en el período estacional de verano existe una mayor cantidad de ficoeritrina disociada de los complejos (Bruna Jofré, 2001), nos centramos en el estudio en las proteínas Linker γ^{31} y γ^{33} , las que serían las responsables de mantener la estabilidad de los hexámeros de ficoeritrina y limitar el crecimiento de las varillas (Liu L. , Chen, Zhang, & Zhou, 2005). Además, analizamos la expresión de la subunidad β^{18} de aloficocianina (ApcF) y del *linker* del *core* Lc (ApcC).

Desde nuestros estudios de la estabilidad de expresión de distintos genes candidatos a genes de referencia, determinamos que nuestros análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR debían ser normalizados contra la media geométrica de los genes de referencia TUBB2B y eRF3 (Figura 12), y que concuerda con lo publicado respecto del uso de combinaciones de al menos 2 genes de referencia para estudios de expresión génica en Gracilariales en contextos de aclimatación a temperatura y a deshidratación (Ding, y otros, 2015; Alves-Lima, y otros, 2017).

La interpretación de los cambios en los niveles de expresión para los genes *linker* la haremos en base a su posición estructural dentro del PBS de *Griffithsia pacifica*, debido a que es la única estructura completa de un PBS para un alga roja eucarionte. Corresponde a un ficobilisoma obtenido bajo un fotoperíodo de verano, de estructura tipo bloque que presenta un core de 3 cilindros de aloficocianina (A, A' y B) de cuales A y A' corresponden a un hexámero de APC unidos en una disposición cara-cara y un trímero extra unido a contracara del hexámero, mientras que B corresponde a dos trímeros unido

contracara-contracara. Los hexámeros se encuentran estabilizados por el *linker core* (L_C) y por el *linker core*-membrana (L_{CM}); L_C presenta un único dominio Pfam01383 hacia el extremo carboxilo terminal unido al dominio Pfam00427 del dominio Reg1 del L_{CM}, los cuales interactúan con las subunidades β adyacentes a ellos en la cara interna del hexámero de APC. De esta forma, los niveles del *linker core* se relacionarían con el número de ficobilisomas totales ya que, para el modelo de PBS de *G. pacifica*, existen sólo dos L_C por *core* de ficobilisoma. Nuestros resultados de expresión a nivel de mensajero del gen nuclear que codifica al L_C (gen *ApcC*) indican un aumento de casi el doble (1,8 veces) en la condición de invierno respecto a la de verano. Se ha determinado en *Cyanophora paradoxa* (Glaucocystophyta) que el L_C traducido en el citoplasma es rápidamente traslocado al estroma de la cianela (cloroplasto) e incorporado (en su forma madura clivada) a los PBS asociados a la membrana tilacoidal (Steiner, Pompe, & Löffelhardt, 2003), por lo que un aumento en los niveles del L_C podría interpretarse como un aumento en el número de PBS totales en invierno. Por otro lado, las imágenes de microscopía electrónica de los PBS para *G. chilensis* muestran un *core* tricilíndricos (Dagnino-Leone, y otros, 2017), y se ha sugerido la presencia de 4 trímeros por cilindro. Estos 4 trímeros podrían formar 2 hexámeros, ya que el hexámero es la unidad biológica de APC en *Porphyra yezoensis* (Liu, Jiang, Zhang, & Liang, 1999). De esta forma, un aumento en los niveles del L_C podría relacionarse también con un mayor número de hexámeros cara-cara por cilindro en el *core* del PBS de *G. chilensis*, como el observado para el *core* de PBS de *Nostoc flagelliforme* (Yi, Huang, Kuang, & Sui, 2005). Esta última interpretación sobre el rol de L_C podría explicar lo observado por el grupo de Alexander Glazer en ensayos de pérdida de función del gen *apcC* en la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002, carente de ficoeritrina, y que provoca un fuerte aumento en la fracción de varillas de ficocianina disociadas. En contraste, la composición de la fracción de los PBS intactos tanto en la condición silvestre como en la condición mutante (*ApcC*⁻) es indistinguible en ensayos de absorbancia y dicroísmo circular, aunque los individuos mutantes presentan una reducción significativa en su tasa de crecimiento (Maxson, Sauer, Zhou, Bryant, & Glazer, 1989). Estos resultados indican que el L_C no es esencial para la estructura del *core* de APC, y que es acorde a lo observado en la estructura cristalográfica de APC desde *Porphyra yezoensis*, donde se observan hexámeros pero en una

conformación menos empaquetada (*loose*) en ausencia de *linker* (Liu, Jiang, Zhang, & Liang, 1999). Sin embargo, y como se deduce desde la estructura del PBS de *G. pacifica*, los hexámeros generan un mayor número de puntos de anclaje para las varillas, a través de los diferentes *linker* varilla-*core* (Zhang, y otros, 2017), y que podría relacionarse a un aumento en la captación de luz.

Antes de seguir, es necesario hacer notar que también analizamos la expresión del *linker core*-membrana (L_{CM}) para el cual obtuvimos valores de amplificación muy bajos ($C_t > 30$) y los sets de partidores empleados presentaron eficiencias muy bajas (datos no mostrados). Por esta razón lo obviamos de nuestro análisis.

Para corroborar los resultados obtenidos con el *linker core* respecto a los cambios observados en invierno respecto de verano, y debido a que no pudimos analizar la expresión del *linker core*-membrana, decidimos analizar la expresión de la unidad alternativa de aloficocianina denominada subunidad β^{18} ($\beta^{18.5}/\beta^{16}$), codificada por el gen cloroplastidial *ApcF* (Hagopian, Reis, Kitajima, Bhattacharya, & de Oliveira, 2004). En cianobacterias se ha observado previamente que esta subunidad participa del mismo trímero que el L_{CM} , demostrándose además su interacción directa mediante ensayos de entrecruzamiento (Lundell & Glazer, 1983; Liu, y otros, 2013). En la estructura del PBS desde *Griffithsia pacifica* se observa que *ApcF* se posiciona en el mismo trímero en el que se encuentra el dominio α del L_{CM} (α - L_{CM}), pero en monómeros α/β diferentes, y cerca de la interfaz entre los dos cilindros basales. *ApcF* interacciona con el L_{CM} en varios puntos de contacto:

hélice F' + *loop* N-terminal hélice E de *ApcF* : α - L_{CM} + Reg1-CTE de L_{CM}
 hélice E de *ApcF* : Reg1-NTE de L_{CM}

La ficocianobilina (PCB) en el dominio α - L_{CM} está muy cerca de la subunidad *ApcF* adyacente; los residuos aromáticos Tyr60 y Tyr79 en *ApcF* se encuentran a menos de 5Å de la PCB del dominio α - L_{CM} (Zhang, y otros, 2017). Ya que *ApcF*/ β^{18} posee propiedades espectroscópicas similares a los de la subunidad *ApcB* (Lundell & Glazer, 1981; Bryant, de Lorimier, Guglielmi, & Stevens, 1990; Biswas, y otros, 2010), es probable que su rol en la transferencia de energía dentro del PBS se deba a su influencia sobre el ambiente en torno a la PCB, modulando la emisión de fluorescencia del emisor

terminal L_{CM} , ya que la pérdida de función del gen *ApcF* en *Synechococcus* sp. PCC 7002 provoca un desplazamiento hipsocrómico (*blue shift*) del espectro de emisión de fluorescencia del *core* (complejo 18S), sin compromiso de la estabilidad del complejo (Gindt, Zhou, Bryant, & Sauer, 1994), y que es similar aunque en menor extensión al desplazamiento observado producto de la pérdida del dominio α (PBL) del L_{CM} en preparaciones de PBS desde *Synechocystis* sp. PCC 6803, mediante delección de la región que lo codifica dentro del gen *ApcE* (Elanskaya, y otros, 2018).

Por otro lado, existe un aumento de la emisión de ficocianina en las preparaciones del *core* en *Synechococcus* sp. PCC 7002 mutantes para *ApcF* que podría dar cuenta de un desacople entre las varillas y el *core*, sumado a una reducción del rendimiento cuántico a 680 nm en la componente que representaría la emisión a través de $L_{CM}/ApcE$ (Gindt, Zhou, Bryant, & Sauer, 1994). El desacople entre las varillas de PC y el *core* pareciera ser del tipo funcional más que físico, ya que el análisis mediante criomicroscopía electrónica de partícula única de los PBS aislados desde *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante para *ApcF* presentan 1 a 2 varillas extras unidades en la parte inferior del *core* de APC, lo que impediría su asociación al PSII (Chang, y otros, 2015). De esta forma, la presencia de *ApcF* regularía el correcto ensamblaje del PBS al eliminar sitios de unión incorrectos para las varillas dependientes probablemente de *ApcB*.

Similares resultados fueron observados en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y, adicionalmente, el estudio de la emisión de fluorescencia a 77 K de los complejos de captación de luz completos desde estas células mostró que la pérdida de función de *ApcF* genera una reducción de la transferencia de luz desde los ficobilisomas hacia el fotosistema II y en menor medida hacia el fotosistema I, cuando las células han sido incubadas por un período corto de 10 minutos a luz roja previo a la excitación de las varillas de ficocianina a 600 nm (estado 1) (Ashby & Mullineaux, 1999). Este patrón de emisión de fluorescencia es idéntico a aquel obtenido como respuesta a un período rápido de oscuridad previo a la excitación a 600 nm, definido como estado 2; el cambio reversible y en el rango de minutos entre los estados 1 y 2 es característico del fenómeno denominado transiciones de estado (Mullineaux & Emlyn-Jones, 2004; Chukhutsina, Bersanini, Aro, & van Amerongen, 2015). Las transiciones de estado corresponden al componente de velocidad media (qT ; ≥ 10 minutos) del mecanismo de fotoprotección a corto plazo llamado

Apagamiento de la Fluorescencia de Clorofila Independiente de Reacciones Fotoquímicas (*Non-Photochemical Quenching*, NPQ o qN), ampliamente estudiado en plantas, algas verdes y cianobacterias. El principal componente del NPQ, y el más rápido, es el apagamiento dependiente de energía o pH (qE; segundos a un par de minutos), y se relaciona con la disipación a la forma de calor del exceso de luz absorbida por los complejos antena, mientras que la fotoinhibición es el componente menor y el más lento (qI; horas). El mecanismo implicado en qE responde a la fuerte caída en el pH del lumen tilacoidal bajo alta irradiancia que induce cambios conformacionales en los componentes del PSII y de los complejos antena producto de fosforilación y protonación de algunos de sus residuos (Müller, Li, & Niyogi, 2001).

A pesar de que el primer reporte de transiciones de estados fue reportado en el alga roja unicelular *Porphyridium cruentum* (Murata, 1969), este fenómeno ha sido descrito en mucho menor extensión en algas rojas, como por ejemplo en *Phorphyra yezoensis* (actual *Pyropia yezoensis*, Rhodophyta) (Peng, y otros, 1998). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en cianobacterias, el perfil de fluorescencia observado en algas rojas tras un período de adaptación a oscuridad corresponde al del estado 1, mismo estado observado en respuesta a la adaptación al rojo lejano, mientras que el estado 2 se observa en respuesta a la adaptación a luz verde (Delphin, Duval, Etienne, & Kirilovsky, 1996).

Según los antecedentes antes expuestos, el aumento moderado de ApcF cercano al 50% en invierno respecto de verano podría responder a dos fenómenos. Por un lado, un aumento de la subunidad β^{18} en invierno permitiría aumentar la eficiencia en la conducción de luz desde las varillas hacia al L_{CM} en condiciones de menor exposición de luz debido al fotoperíodo de la estación, mientras que su disminución en verano aumentaría la población de PBS en estado 2, asociado a una menor transferencia hacia el PSII y que correspondería a un mecanismo de fotoprotección a la exposición eventual a altas irradiancias debido a la estacionalidad. Esta interpretación es compatible más con un cambio en la estructura/función que en el número de los PBS entre los fotoperíodos (como se discutió para ApcC), y concuerda con el hecho de que en todas las macroalgas rojas (*subphylum Eurhodophytina*) existe un bloque de sintenia en el genoma cloroplastidial que contiene entre otros al gen *ApcF* y al gen *Ycf20* (Ng, y otros, 2017). Ambos genes se transcriben como un único mensajero bicistrónico en el alga roja pluricelular

Aglaothamnion neglectum (Apt & Grossman, 1993); *Arabidopsis thaliana* presenta dos parálogos del gen *Ycf20* que codifican las proteínas NPQ6 y NPQ7 implicadas en la disipación termal en condiciones de estrés fotooxidativo (Jung & Niyogi, 2010).

Respecto de los péptidos *linker* γ , gracias a la estructura del ficobilisoma de *Griffithsia pacifica* se logró determinar la presencia de un dominio de unión a cromóforo en los *linker* γ , y que es característico de los fitocromos (Zhang, y otros, 2017). Este dominio es rico en hélices, lo que ya fue previamente propuesto en el modelo del Linker γ^{33} de *Gracilaria chilensis* (Lobos-González, 2014). La mayoría de las proteínas *linker* γ en *G. pacifica* poseen 5 bilinas con la excepción del dominio CBD γ del Linker γ 7 (LRG7), el cual contiene sólo cuatro bilinas. Esto difiere de los resultados obtenidos por nuestro grupo para el Linker γ^{33} (LRG4) de *G. chilensis*, en los que se identificó mediante estudios espectroscópicos y de espectrometría de masas la presencia de 3 cromoforilaciones: ficourobilina (PUB) unida a la cisteína 95, ficoeritrobilina (PEB) unida a la cisteína 172, y una PUB doblemente unida a las cisteínas 62 y 73, tal como ocurre en la subunidad β de PE de *G. chilensis* (Vásquez-Suárez, y otros, 2018). Un estudio reciente de caracterización de R-PE de *Porphyridium cruentum* identificó 4 péptidos *linker* γ , uno de los cuales presenta sólo 3 ficobilinas unidas (LR $\gamma^{3399.5}$), aunque carece de las cisteínas 62 y 73 de *G. chilensis* y presenta identidad de secuencia con el LRG8 de *G. pacífica* que posee 5 bilinas unidas (Tamara, Hoek, Scheltema, Leney, & Heck, 2019). De esta forma, se podría suponer que en *P. cruentum*, el *linker* LR $\gamma^{3399.5}$ presenta 3 ficobilinas unidas a una única cisteína. En este sentido, el linker LRG4 de *G. pacifica* que presenta la mayor identidad con el Linker γ^{33} de *G. chilensis* sí presenta la cisteína 73, aunque presenta 5 ficobilinas unidas (observación personal basada en alineamientos múltiples empleando Clustall Omega). Aún incluso ante esta abrumadora variedad en la unión de ficobilinas sobre los *linker* γ , el espectro de absorción de la fracción que contiene los *linker* γ de *Porphyridium cruentum* es idéntico al del Linker γ^{33} de *G. chilensis*, con máximos de absorción a 494 nm y 554 nm. El si existen otros *linker* γ en *Gracilaria chilensis* es una pregunta abierta en esta tesis, que podría ser resuelta usando las secuencias disponibles actualmente para *Griffithsia pacifica* y *Porphyridium cruentum* sobre el transcriptoma de nuestro modelo de estudio, aunque la existencia de sólo dos *linker* γ ya ha sido demostrada en otra alga

roja pluricelular (*Polysiphonia urceolata*) (Wang, Wang, Fu, & Sun, 2015), con identidad de secuencia por LRG4 y LRG5 de *G. pacífica*.

Por otro lado, y gracias a los transcriptomas, genomas e EST disponibles en los últimos años para algas rojas además de la extensa información disponible para cianobacterias, algas verdes y plantas terrestres, el grupo de investigación dirigido por Debashish Bhattacharya y Hwan Su Yoon (Lee, Kim, Bhattacharya, & Yoon, 2019) realizó un análisis filogenético, el que sugiere que las algas rojas han diversificado su maquinaria ficobilisoma posterior a su divergencia con la división Glaucophyta (algas verdes unicelulares con núcleo y cloroplastos que presentan PBS con APC y PC). De esta forma, uno podría suponer que los péptidos *linker* asociados a las varillas compuestas con ficoeritrina aparecieron después de esta separación evolutiva, a pesar de que ficoeritrina esta presente en los ancestros comunes entre estas algas y las cianobacterias, pero en los que su asociación es producto de otros *linker*; estos *linker* fueron asignados como *linker* γ (Guan, Qin, Zhao, Zhang, & Tang, 2007), pero que al comparar con las secuencias de *Griffithsia pacífica* corresponden a los *linker* LRC2, LRC3 y LR3 (observación personal basada en análisis de BLAST contra las proteínas de *Griffithsia pacífica* en la base de datos UniProt). Más aún, Bhattacharya y Yoon proponen que las familias de péptidos *linker* LRG4 y LRG5 (Linker γ^{33} y Linker γ^{31} , respectivamente) son específicos de algas rojas, representando un clado independiente del resto de los péptidos *linker*, de origen desconocido, de los cuales LRG4 es el más antiguo evolutivamente, estando presente en Cyanidiophyceae (algas rojas unicelulares extremófilas). Debido a lo anteriormente expuesto, además de los estudios sobre el clonamiento de los *linker* γ , de su caracterización como genes nucleares y de su presencia en las estructuras cristalográficas de ficoeritrina (Glazer & Hixson, 1977; Algarra, Thomas, & Mousseau, 1990; Apt, Hoffman, & Grossman, 1993; Bernard, Etienne, & Thomas, 1996; Chang, y otros, 1996; Jiang, Zhang, & Liang, 1999; Contreras-Martel, y otros, 2001; Apt, Metzner, & Grossman, 2001), los estudios funcionales son escasos debido a que estos *linker* no están presentes en cianobacterias, organismos donde la mayoría de los estudios genéticos se han desarrollado. Sin embargo, a la luz de la estructura del PBS de *Griffithsia pacífica* podemos reinterpretar los resultados obtenidos para dos mutantes de *Gracilaria tikvahiae* obtenidas por incubación con el agente alquilante metonosulfonato de etilo (EMS)

(Kursar, van der Meer, & Alberte, 1983a). Estas mutantes denominadas *vrt* y *vrt*⁵ (de herencia mendeliana) presentan niveles normales de ficoeritrina, aunque esta no se incorpora eficientemente a sus PBS (relación PE : PC de 1 respecto de la silvestre que es de 2) (Kursar, van der Meer, & Alberte, 1983b). La ficoeritrina presente en estos PBS debe estar asociada mediante alguno de los *linker* varilla-*core* de clase II y clase III y por el *linker* varilla clase I, que son responsable de unión de los hexámeros de PE más cercanos al *core* de APC. De esta forma, estas mutantes podrían corresponder a mutantes para los Linker γ^{33} (LRG4) y/o Linker γ^{31} (LRG5). El análisis electroforético de estos ficobilisomas muestra la presencia de una banda de proteína de movilidad relativa en el rango de 30.000 (~30 kDa) para mutantes *vrt*, similar a la observable en la silvestre y que podría corresponder los dos *linker* LRG4 y LRG5 solapados (la mutación afectaría la estructura/función del *linker* γ). De forma alternativa, esta banda podría corresponder a los *linker* varilla-*core*, de similar tamaño a los *linker* γ (la mutación afectaría la síntesis y/o estabilidad del *linker* γ) En este mismo estudio se caracterizaron otras mutantes que mostraron niveles extremadamente bajos de PE (como lo son *NMG-2*, *uai* y *vrt*²), en las que sin embargo existe incorporación de esta ficobiliproteína en los PBS, aunque en muy bajos porcentajes (relación PE : PC menor o igual a 0,22), sugiriendo que la incorporación de PE en los PBS es esencial para la sobrevivencia del alga (dicho de otro modo, mutaciones que eliminen la incorporación de PE al PBS serían letales). Esto podría corresponder a una función diferente de la conducción de luz, como por ejemplo el participar de mecanismos de fotoprotección (Liu, y otros, 2008), o como punto de acople a una proteína relacionada al metabolismo, como lo es la enzima Ferredoxin NADP(H) oxidoreductasa (FNR) que ha mostrado participar de los PBS en *Gracilaria chilensis* (Vorphal M. A., y otros, 2017). Respecto de la identidad molecular de las mutantes, los análisis mediante centrifugación zonal en gradiente de sacarosa de los ficobilisomas desde estas mutantes mostraron que los PBS desde *vrt*⁵ son similares a los silvestres, mientras que los de la mutante *vrt* son diferentes. Debido a que la pérdida del Linker γ^{33} provocaría una pérdida de un mayor número de hexámeros de PE y, por ende, un mayor cambio en la estructura de los PBS, sugerimos que la mutante *vrt* correspondería a la mutación de LRG4, mientras que la mutante *vrt*⁵ sería una mutante del *linker* LRG5. Finalmente, los PBS observados en las preparaciones tanto de *Gracilaria tikvahiae* silvestre como de las mutantes son

pequeños (menores o iguales en promedio a 31,2 nm × 41,2 nm) respecto de los observados en *Gracilaria chilensis* (57,25 nm × 77,4 nm; 35 nm × 77,5 nm y 47,5 nm × 60 nm) (Dagnino-Leone, y otros, 2017). Esto pudiera deberse a que *G. tikvahiae* fue cultivada en un fotoperíodo de 12O/12L a un flujo de fotones promedio de 120 μmol de fotones·m⁻²·s⁻¹ (Kursar, van der Meer, & Alberte, 1983a), el doble de los fotones empleados por nosotros en nuestros cultivos. Los PBS de *Griffithsia pacifica* presentan un tamaño promedio de 40 nm × 70 nm (Zhang, y otros, 2017), semejantes a los de *G. chilensis*, lo que es congruente respecto a que ambos cultivos representan condiciones similares (16L/8O a 50 μmol de fotones·m⁻²·s⁻¹). El tamaño de los ejes de los ficobilisomas mediante microscopía electrónica de transmisión está relacionado con la estructura del ficobilisoma pues a mayor complejidad y número de subunidades mayor el tamaño de los ejes. De esta forma, y en base a la caracterización de los ficobilisomas de *Porphyra umbilicalis* (Bangiophyceae) podemos apreciar la existencia de dos tipos de ficobilisomas: uno del tipo hemidisoidal y otro del tipo elipsoidal (Algarra, Thomas, & Mousseau, 1990), aunque este último se asemeja al tipo en bloque caracterizado en *Griffithsia pacifica*. Interesantemente, el de tipo hemidisoidal es idéntico a uno de los observados en las microscopías electrónicas de los PBS para *Gracilaria chilensis*, mientras que el elipsoidal (o en bloque) correspondería a una versión más saturada en varillas del tipo hemidisoidal.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, y asumiendo que estos dos tipos de PBS hemidisoidal y en bloque representan las estructuras predominantes en verano e invierno respectivamente, deseamos proponer un modelo de arquitectura para el ficobilisoma en las dos condiciones de fotoperíodo en estudio, en base a las siguientes suposiciones:

- 1) La relación remolar de las ficobiliproteínas (como trímeros) para *Gracilaria chilensis* crecida bajo condiciones de fotoperíodo de verano es de PE : PC : APC = 10 : 2 : 10 (Bunster, Tellez, & Candia, 1997). Esta relación es muy diferente de la informada para *Griffithsia pacifica* (106 : 12 : 8) (Zhang, y otros, 2017).
- 2) El número de bandas observables mediante la tinción de azul de Coomassie de las preparaciones de ficobilisomas desde *Griffithsia pacifica* es notoriamente mayor

al observado en *Gracilaria chilensis*, por lo que especulamos que en la primera existen un mayor número de péptidos *linker* diferentes (Zhang, y otros, 2017; Vorphal M. , y otros, 2017). Esto sería la razón de la estructura más simple del PBS de *G. chilensis*, que es del tipo hemidisoidal, siendo el más representativo aquel con un *core* tricilíndrico acompañado de 5 a 6 varillas de 3 a 4 hexámeros (Dagnino-Leone, y otros, 2017).

- 3) Los cambios en el número de un péptido *linker* por PBS entre los fotoperíodos de verano e invierno en *G. chilensis* deben ser proporcionales a los cambios observados a nivel de mensajero para aquellos genes codificados en el genoma cloroplastidial, como lo es *ApcF* (subunidad β^{18} de aloficocinina). En el caso de los genes codificados en el genoma nuclear (como los *linker* γ y el gen *ApcC*), sólo se puede asumir que los niveles de proteínas deben aumentar o disminuir según lo haga el RNA mensajero, sin embargo, estos genes están sujetos a un mayor número de niveles de regulación.
- 4) Desde la estructura informada para el ficobilisoma de *G. pacifica*, deducimos que el ensamblaje del ficobilisoma de *G. chilensis* requiere del *linker* del *core* membrana (que no pudimos determinar en esta tesis) y de al menos otras 4 clases de *linker*, que no han sido identificados aún en *Gracilaria chilensis*, y que son:
 - a. *Linker* Varilla Clase I: Une un hexámero de PC al cilindro central (B) del *core* de APC.
 - b. *Linker* Varilla-Core Clase I: Une un hexámero de PC al cilindro lateral (A o A') del core de APC.
 - c. *Linker* Varilla-Core Clases II y III: Unen un hexámero de PE al core al cilindro lateral (A o A') del core de APC.

El modelo presentado en la figura 14 propone una conformación para cada fotoperíodo que satisface cada punto anteriormente mencionado, aunque no descartamos que otras configuraciones puedan satisfacerlas. Sorprendentemente, ambos tipos de ficobilisomas presentan proporciones de ficobiliproteínas similares (5 : 1 : 5 para verano y 7 : 1 : 3 para inviernos) lo que podría explicar porque macroscópicamente la coloración de los ficobilisomas obtenidos desde el alga en las estaciones de invierno y verano es

similar (observaciones no publicadas desde el laboratorio). A nivel molecular, los modelos sugieren que los cambios observados a nivel del *linker* del *core* estarían relacionados con la formación de un core tricilíndrico (A, A' y B) compuesto cada uno de dos hexámeros unidos cara a cara, similar al de *Synechocystis* sp. strain PCC6803 (Arteni, Ajlani, & Boekema, 2009). El mayor número de varillas en invierno sería consecuencia de un aumento en los niveles de los *linker* varilla clase I, varilla *core* clase I y varilla *core* clases II y III. Para comprobar esta hipótesis, se podría reanalizar la base de datos del transcriptoma que obtuvimos en esta tesis empleando las secuencias de proteínas informadas para *G. pacifica* y luego diseñar partidores para su amplificación mediante RT-qPCR. Respecto de la subunidad β^{18} de aloficocianina, tenemos que su aumento en invierno se relacionaría con una mayor eficiencia en la transferencia de luz desde las varillas de sólo PE hacia el L_{CM}, cuando los dos cilindros laterales unen varillas. Además, un aumento en ApcF evitaría la formación de otras varillas, tal como se mencionó anteriormente. Por último, el modelo es compatible con la existencia de sólo dos *linker* γ , esto debido a que en *G. pacifica*, la incorporación de nuevas varillas de ficoeritrina requiere de la existencia de otras proteínas *linker* γ (LRG6 y LRG8 por ejemplo), que no han sido caracterizadas en *Gracilaria chilensis*, y que sería la causa de esta estructura más simple respecto al de *Griffithsia pacifica*. Finalmente, la presencia de ficobilinas unidas a estos *linker* γ de seguro debe impactar en la vías de conducción y en la eficiencia de conducción, por lo que su aumento en invierno sería una adaptación evolutiva a condiciones con baja luz debido a que ellos incrementan la sección transversal de la antena sin necesidad de expandir el espacio que ocupa el PBS, tal como se sugiere en (Zhang, y otros, 2017).

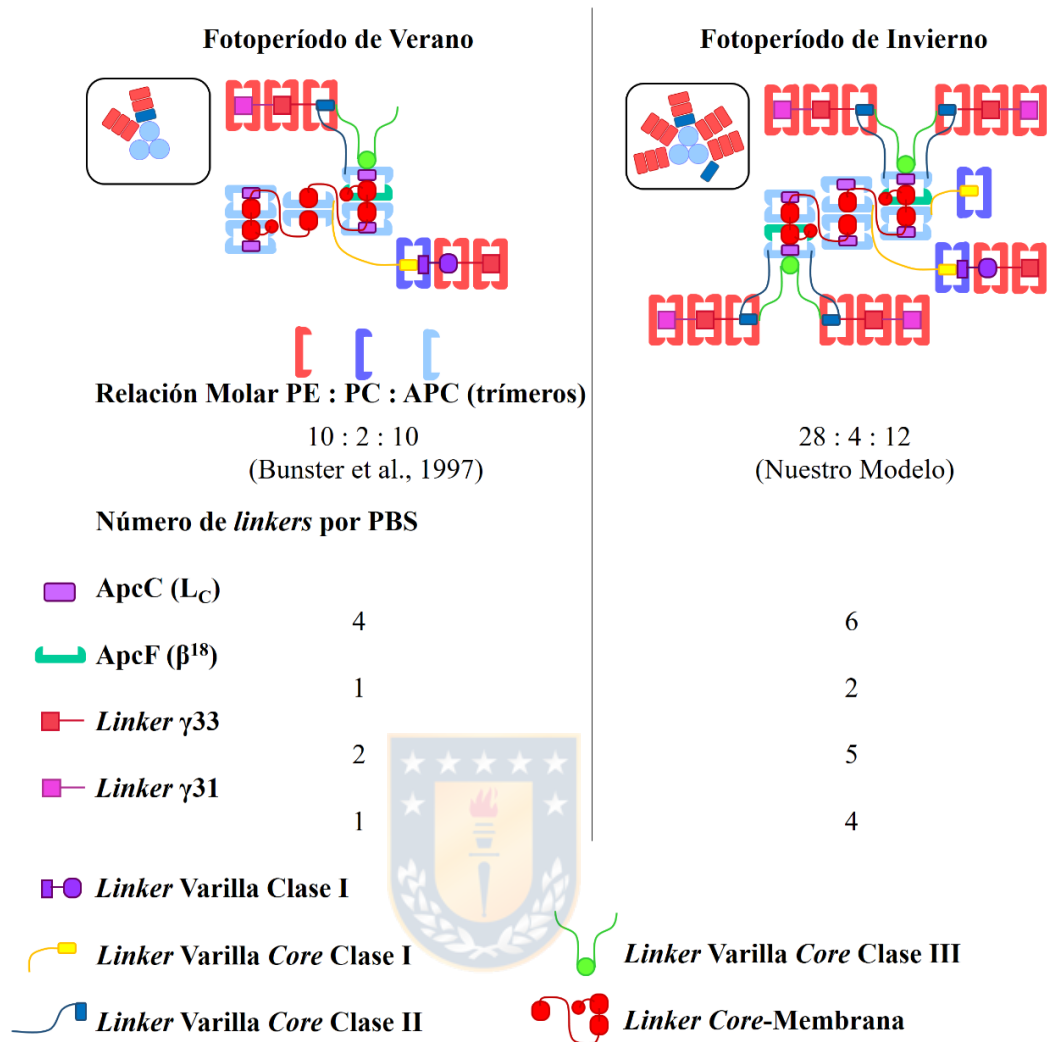


Figura 14: Modelo de organización de los ficobilisomas de *Gracilaria chilensis* en respuesta a los fotoperíodos de invierno y verano.

Representación esquemática en base a los datos obtenidos en la tesis y a la estructura disponible para el PBS de *Griffithsia pacifica* (Zhang, y otros, 2017). Los fotoperíodos indicados correspondientes a verano fue de 16 horas luz/8 horas oscuridad, mientras que para invierno fue de 16 horas oscuridad/8 horas luz. Para el caso de la subunidad β¹⁸, se esquematiza como un trímero de forma de representar aquel trímero de aloficocianina donde se encuentra reemplazando a la subunidad β de aloficocianina. No se indican las relaciones molares de los linker cuyos niveles de mensajero no fueron determinados en esta tesis. Fuente: Elaboración propia en base al esquema presentado por (Zhang, y otros, 2017).

9 Conclusiones

Los antecedentes expuestos indican que en *Gracilaria chilensis* existen cambios en los niveles de RNA mensajero que codifican los genes en respuesta a cambios en el fotoperíodo, los que podrían traducirse en una reorganización a nivel de *core* y de varillas de ficobilisomas. Esta reorganización sería tanto en la cantidad como en la composición de las proteínas que conforman el ficobilisoma, tanto en las proteínas estructurales de los hexámeros como en los péptidos *linkers*, y que podrían corresponder a un mecanismo de optimización de eficiencia fotosintética estacional frente a períodos de menor exposición luminosa, así como también a una estrategia de fotoprotección durante períodos de exposición mas prolongado.



10 Perspectivas

La información recopilada en esta tesis, a nivel de secuencias de RNA mensajeros podrían contribuir en descubrir nuevas secuencias de péptidos aún no identificados de proteínas *linker* en *Gracilaria chilensis*, complementando el avance de este complejo proteico llamado ficobilisoma. Esta contribución se puede extender a la comprensión y establecimiento de rutas metabólicas en *Gracilaria chilensis*, que continúa siendo un recurso marítimo de importancia en nuestro país.

11 Bibliografía

Adir, N., Dines, M., Klartag, A., McGregor, & Melamed-Frank, M. (2006). Assembly and disassembly of phycobilisomes. En J. Shively, *Microbiology Monographs: Inclusions in Prokaryotes* (págs. 47-77). Berlin: *Springer*.

Adl, S. M., Simpson, A. G., F. M., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., . . . Lynn, D. H. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 52(5), 399-451.

Agilent Technologies, Inc. (2004). *Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide* (2004 ed.). La Jolla: Agilent Technologies, Inc.

Algarra, P., Thomas, J.-C., & Mousseau, A. (1990). Phycobilisome Heterogeneity in the Red Alga *Porphyra umbilicalis*. *Plant Physiol.*, 92(3), 570–576.

Alves-Lima, C., Cavaçana, N., Teixeira Chaves, G. A., Oliveira de Lima, N., Stefanello, E., Colepicolo, P., & Takeshi Hotta, C. (2017). Reference genes for transcript quantification in *Gracilaria tenuistipitata* under drought stress. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 731-740.

Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15), 5245-5250.

Apt, K. E., & Grossman, A. R. (1993). The Phycobilisome β 18 Subunit Gene Of Allophycocyanin Is Located On The Plastid Genome In *Aglaothamnion Neglectum* (Rhodophyta) And Co Transcribed With An Unidentified Open Reading Frame. *J. Phycol.*, 29, 716-718.

Apt, K. E., Hoffman, N. E., & Grossman, A. R. (1993). The gamma subunit of R-phycoerythrin and its possible mode of transport into the plastid of red algae. *J Biol Chem.*, 22, 16208-16215.

Apt, K. E., Metzner, S., & Grossman, A. R. (2001). The γ subunits of Phycoerythrin from a Red Alga: Position in Phycobilisomes and sequence characterization. *J. Phycol.*, 37(1), 64–70.

Apt, K., Collier, J., & Grossman, A. (1995). Evolution of the phycobiliproteins. *J. Mol. Biol*, 248, 76-79.

- Arteni, A. A., Ajlani, G., & Boekema, E. J. (2009). Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochim Biophys Acta.*, 1787(4): 272-9.
- Ashby, M. K., & Mullineaux, C. W. (1999). The role of ApcD and ApcF in energy transfer from phycobilisomes to PS I and PS II in a cyanobacterium. *Photosynth Res.*, 61(2), 169–179.
- Bernard, C., Etienne, A.-L., & Thomas, J.-C. (1996). Synthesis and Binding of Phycoerythrin and its associated Linkers to the Phycobilisome in *Rhodella violacea* (Rhodophyta): Compared effects of high light and translation inhibitors. *J. Phycol.*, 2, 265-271.
- Biswas, A., Vasquez, Y. M., Dragomani, T. M., Kronfel, M. L., Williams, S. R., Alvey, R. M., . . . Schluchter, W. M. (2010). Biosynthesis of Cyanobacterial Phycobiliproteins in *Escherichia coli*: Chromophorylation Efficiency and Specificity of All Bilin Lyases from *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002. *Appl Environ Microbiol.*, 76(9), 2729–2739.
- Björkman, O., & Demmig, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489-504.
- Bookout, A. L., Cummins, C. L., Kramer, M. F., Pesola, J. M., & Mangelsdorf, D. J. (2006). High-Throughput Real-Time Quantitative. UNIT 15.8. En F. M. Ausubel, B. Roger, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, Current Protocols in Molecular Biology (págs. 15.8.1-15.8.28). Hoboken, New Jersey, EE.UU.: John Wiley & Sons, Inc.
- Bruna Jofré, C. (2001). Purificación y caracterización de ficobilisomas de *Gracilaria chilensis*, Tesis para optar a título de Bioquímico. Concepción, Chile: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Concepción.
- Bryant, D., de Lorimier, R., Guglielmi, G., & Stevens, S. (1990). Structural and compositional analyses of the phycobilisomes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Analyses of the wild-type strain and a phycocyanin-less mutant constructed by interposon mutagenesis. *Arch Microbiol.*, 6, 550-560.
- Bunster, M., Tellez, J., & Candia, A. (1997). Characterization of phycobiliproteins present in *Gracilaria chilensis* (Vol. 42). Boletín de la Sociedad Chilena de Química.
- Butterfield, N. J. (2000). *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology*, 26(3), 386-404.

- Chan, C. X., & Bhattacharya, D. (2011). Plastid Origin and Evolution. En Wiley, *Encyclopedia of Life Science* (págs. 1-8). Chichester: John Wiley & Sons.
- Chang, L., Liu, X., Li, Y., Liu, C., Yang, F., Zhao, J., & Sui, S. (2015). Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. *Cell Res*, 25(6), 726-737.
- Chang, W., Jiang, T., Wan, Z., Zhang, J., Yang, Z., & Liang, D. (1996). Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol.*, 262(5), 721-731.
- Chukhutsina, V., Bersanini, L., Aro, E.-M., & van Amerongen, H. (2015). Cyanobacterial Light-Harvesting Phycobilisomes Uncouple From Photosystem I During Dark-To-Light Transitions. *Sci Rep.*, 5, 14193.
- Cock, J. M., & Coelho, S. M. (2011). Algal models in plant biology. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2425-2430.
- Collén, J., Porcel, B., Carré, W., Ballg, S. G., Chaparro, C., Tonona, T., . . . Boyen, C. (2013). Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(13), 5247–5252.
- Collén, P. N., Collén, J., da Silva Reis, M., Pedersen, M., Setubal, J. C., Varami, A. M., . . . Oliveira, M. C. (2012). Analysis of expressed sequence tags from the agarophyte *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J Appl Phycol*, 641-647.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
- Contreras-Martel, C., Martinez-Oyanedel, J., Bunster, M., Legrand, P., Piras, C., Vernede, X., & Fontecilla-Camps, J. (2001). Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 57(Pt 1), 52-60.
- Cunninham, F., Dennenberg, R., Mustardy, L., Jursinic, P., & Gantt, E. (1989). Stoichiometry of Photosystem I, Photosystem II, and Phycobilisomes in the Red Alga *Porphyridium cruentum* as a Function of Growth Irradiance. *Plant Physiol.*, 91(3), 1179-1187.
- Dagnino-Leone, J., Figueroa, M., Mella, C., Vorphal, M.-a. A., Kerff, F., Vásquez, A. J., . . . Martínez-Oyanedel, J. (2017). Structural models of the different trimers present in the

core of phycobilisomes from *Gracilaria chilensis* based on crystal structures and sequences. *PLoS One*, 12(5): e0177540.

Delphin, E., Duval, J.-C., Etienne, A.-L., & Kirilovsky, D. (1996). State Transitions or Δ pH-Dependent Quenching of Photosystem II Fluorescence in Red Algae. *Biochemistry*, 35(29), 9435–9445.

Demmig, B., & Björkman, O. (1987). Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta*, 171(2): 171-184.

Ding, Y., Sun, H., Zhang, R., Yang, Q., Liu, Y., Zang, X., & Zhang, X. (2015). Selection of reference gene from *Gracilaria lemaneiformis* under temperature stress. *Journal of Applied Phycology*, 27, 1365-1372.

Dixon, P., & Richardson, W. N. (1970). Growth And Reproduction In Red Algae In Relation To Light And Dark Cycles. *Ann Ny Acad Sci*, 175(1): 764-777.

Elanskaya, I., Zlenko, D., Lukashev, E., Suzina, N., Kononova, I., & Stadnichuk, I. (2018). Phycobilisomes from the mutant cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 missing chromophore domain of ApcE. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.*, 1859(4), 280-291.

Falkowsky, P. G., & LaRoche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *J Phycol*, 27, 8-14.

Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann alen der Physik*, 437(1-2), 55-75.

Fujita, Y., Murakami, A., Aizawa, K., & Ohki, K. (1994). Short-term and Long-term Adaptation of the Photosynthetic Apparatus: Homeostatic Properties of Thylakoids. En B. D. A., *The Molecular Biology of Cyanobacteria. Advances in Photosynthesis.* (págs. volumen 1: 677-692). Dordrecht: Springer.

Garnier, F., Dubacq, J., & Thomas, J. (1994). Evidence for a transient association of new proteins with *Spirulina maxima* phycobilisome in relation to light intensity. *Plant Physiol.*, 106, 747-754.

Genty, B., Harbinson, J., Cailly, A., & Rizza, F. (1996). Fate of excitation at PS II in leaves: the non-photochemical side. The Third BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis (pág. 28). Shaffield: University of Sheffield.

Gindt, Y. M., Zhou, J., Bryant, D. A., & Sauer, K. (1994). Spectroscopic studies of phycobilisome subcore preparations lacking key core chromophores: assignment of

excited state energies to the Lcm, beta 18 and alpha AP-B chromophores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1186(3): 153-162.

Glazer, A. (1982). Phycobilisomes: Structure and Dynamics. *Annual Review of Microbiology*, 36, 173-198.

Glazer, A. (1985). Light harvesting by phycobilisomes. *Annual Review of Biophysical Chemistry*, 14, 47-77.

Glazer, A. (1989). Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.*, 264, 1-4.

Glazer, A. N., & Hixson, C. S. (1977). Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. *J Biol Chem.*, 252(1), 32-42.

Gómez, I., Figueroa, F., Huovinen, P., Ulloa, N., & Morales, V. (2004). Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture*, 244(1-2), 369-382.

Götz, S., García-Gómez, J., Terol, J., Williams, T., Nagarej, S., Nueda, M., . . . Conesa, A. (2008). High throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*, 36(10), 3420-3435.

Grabowski, J., & Gantt, E. (1978). Excitation energy migration in phycobilisomes comparison of experimental results and theoretical prediction. *Photochemistry and Photobiology*, 28(1), 47-54.

Guan, X., Qin, S., Zhao, F., Zhang, X., & Tang, X. (2007). Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: divergence and evolution. *Int J Biol Sci.*, 3 (7), 434-445.

Häder, D.-P. (2001). Adaptation to UV Stress in Algae. En L. Rai, & G. JP, *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanism* (págs. 173-202). Berlin: *Springer*.

Hagopian, J. C., Reis, M., Kitajima, J. P., Bhattacharya, D., & de Oliveira, M. C. (2004). Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights into the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. *Journal of molecular evolution*, 59(4): 464-477.

Hanel, D., Huppertz, K., & Nultsch, W. (1992). Photo inhibition of photosynthesis and its recovery in red algae. *Bot Acta*, 105, 278-284.

Hanelt, D., Wiencke, C., & Bischof, K. (2003). Photosynthesis in Marine Macroalgae. En A. Larkum, S. Douglas, & J. Raven, *Photosynthesis in Algae* (1a ed.).

- Hanelt, O., Melethersmann, B., Wieneke, C., & Nultsch, W. (1997). Effects of high light stress on photosynthesis of polar macroalgae in relation to depth distribution. *Mar Ecol Prog Ser*, 149, 255-266.
- Haxo, P., & Blink, L. (1950). Photosynthetic action spectra of marine algae. *J. Gen Physiol.*, 33, 389-442.
- Ho, C., Teoh, S., Rahim, R., & Phang, S. (2009). Profiling the transcriptome of *Gracilaria changii* (rodophyta) in response to light deprivation. *Mar Biotechnol.*, 11, 513-519.
- Iwasaki, H. (1965). Studies on the physiology and ecology of *Porphyra tenera*. *J Fac of Fish Animal Husb Hiroshima Univ*, 6: 133-211.
- Jiang, T., Zhang, J.-p., & Liang, D.-c. (1999). Structure and function of chromophores in R-Phycocerythrin at 1.9 Å resolution. *Proteins*, 34(2), 224-231.
- Jung, H.-S., & Niyogi, K. K. (2010). Mutations in Arabidopsis YCF20-like genes affect thermal dissipation of excess absorbed light energy. *Planta*, 231(4), 923-937.
- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., . . . Gray, M. W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(12), 670-676.
- Kehoe, & Gutu. (2006). Responding to Color: The regulation of complementary chromatic adaptaton. *Annual Review Plant Biology*, 57, 127-150.
- Kiang, N. Y. (2008). The Color of Plants on Other Worlds. *Scientific American*, 298, 48-55.
- Kinoshita, S., & Teramoto, K. (1958). Some observations on the photosynthesis of *Porphyra-frond*. *The Bulletin of Japanese Society of Phycology*, 6(1): 11-16.
- Kowalczyk, N., Rousvoal, S., Hervé, C., Boyen, C., & Collén, J. (2014). RT-qPCR Normalization Genes in the Red Alga *Chondrus crispus*. *PLoS One*, 9(2), e86574.
- Krause, G., & Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 42, 313-349.
- Kursar, T. A., van der Meer, J., & Alberte, R. S. (1983a). Light-Harvesting System of the Red Alga *Gracilaria tikvahiae* I. Biochemical Analyses of Pigment Mutations. *Plant Physiol.*, 73(2), 353-360.
- Kursar, T. A., van der Meer, J., & Alberte, R. S. (1983b). Light-Harvesting System of the Red Alga *Gracilaria tikvahiae* II. Phycobilisome Characteristics of Pigment Mutants. *Plant Physiol.*, 73(2), 361-369.

- Lars Dietzel, K. B. (2008). Photosynthetic acclimation: State transitions and adjustment of photosystem stoichiometry – functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS Journal*, 1080–1088.
- Lee, J., Kim, D., Bhattacharya, D., & Yoon, H. S. (2019). Expansion of phycobilisome linker gene families in mesophilic red algae. *Nat Commun.*, 10(1), 4823.
- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D. M., Prado, M., He, G., Gross, M. L., & Blankenship, R. E. (2013). Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science*, 342(6162): 1104-1107.
- Liu, J., Jiang, T., Zhang, J., & Liang, D. (1999). Crystal structure of allophycocyanin from red algae *Porphyra yezoensis* at 2.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24):16945-16952.
- Liu, L., Chen, X., Zhang, Y., & Zhou, B. (2005). Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview. *Biochim Biophys Acta*, 1708(2), 133-142.
- Liu, L., Elmalk, A., Aartsma, T., Thomas, J., Lamers, G., Zhou, B., & Zhang, Y. (2008). Light-induced energetic decoupling as a mechanism for phycobilisome-related energy dissipation in red algae: a single molecule study. *PLoS One.*, 3(9), e3134.
- Lobos-González, F. A. (2014). Secuenciación, caracterización bioinformática y modelamiento estructural de la subunidad $\gamma 33$ de R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, Universidad de Concepción, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Concepción, Chile.
- Lorimier, R., Bryant, D., & Stevens Jr, S. (1990). Genetic Analysis of a 9 KDa phycocyanin-associated linker polypeptide. *Biochemistry and Biophysica Acta*, 1019, 29-41.
- Lundell, D. J., & Glazer, A. N. (1983). Molecular architecture of a light-harvesting antenna. Structure of the 18 S core-rod subassembly of the *Synechococcus* 6301 phycobilisome. *Journal of Biological Chemistry*, 258(2), 894-901.
- Lundell, D. L., & Glazer, A. N. (1981). Allophycocyanin B. *J Biol Chem.*, 256(23), 12600-12606.
- Maxson, P., Sauer, K., Zhou, J. H., Bryant, D. A., & Glazer, A. N. (1989). polypeptides, Spectroscopic studies of cyanobacterial phycobilisomes lacking core. *Biochimica et biophysica acta*, 977(1):40-51.

- Moroney, J. V., & Ynalvez, R. A. (2009). Algal Photosynthesis. En J. W. Sons, *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* (págs. 1-7). Chichester.
- Müller, P., Li, X.-P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.*, 125(4), 1558–1566.
- Mullineaux, C. W., & Emlyn-Jones, D. (2004). State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *J Exp Bot.*, 56(411), 389–393.
- Murata, N. (1969). Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.*, 172(2), 242-251.
- Nakamura, Y., Sasaki, N., Kobayashi, M., Ojima, N., Yasuike, M., Shigenobu, Y., . . . Ikeo, K. (2013). The First Symbiont-Free Genome Sequence of Marine Red Alga, *Susabionori* (*Pyropia yezoensis*). *PLoS ONE*, 8(3): e57122.
- Nelson, N., & Ben-Shem, A. (2004). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 5(12), 971-982.
- Ng, P.-K., Lin, S.-M., Lim, P.-E., Liu, L.-C., Chen, C.-M., & Pai, T.-W. (2017). Complete chloroplast genome of *Gracilaria firma* (Gracilariaceae, Rhodophyta), with discussion on the use of chloroplast phylogenomics in the subclass Rhodymeniophycidae. *BMC Genomics*, 18:40.
- Passing, H., & Bablok, W. (1983). A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.*, 21(11), 709-720.
- Peng, G.-H., Mi, H.-L., Jie, P., Shi, D.-J., Shen, Y.-K., Chen, J.-X., . . . Tseng, C. K. (1998). The State Transitions and their Possible Mechanisms of Sporophytes and Gametophytes of *Porphyra Yezoensis*. En G. G., *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. (Vol. I, págs. 209-212). Dordrecht: Springer.
- Pouchucq, L. (2002). Dos morfologías de ficobilisomas en *Gracilaria chilensis*. Composición polipeptídica, estructura y probable función dentro del aparato fotosintético. Concepción: Unidad de Investigación Msc Bioquímica.
- Provasoli, L. (1968). Media and prospects for cultivation of marine algae. En H. A. Watanabe A., *Culture and Collections of Algae* (págs. 47-74). Tokyo: Japanese Society for Plant Physiology.
- Ragan, A., Lluisma, O., & Mark, A. (1997). Expressed sequence tags (ESTs) from the marine red alga *Gracilaria gracilis*. *Journal of Applied Phycology*, 287-293.

- Ravi, R., Walton, K., & Khosrohedari, M. (2018). MISEq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. *Methods Mol Biol.*, (1706), 223-232.
- Reddy, C. R., Gupta, V., & Jha, B. (2010). Developments in Biotechnology of Red Algae. En J. S. Chapman, Red algae in the genomic age (págs. 309-343). London, New York: Springer.
- Ritz, M., Thomas, J., Spilar, A., & Etienne. (2000). Kinetics of photoacclimation in response to a shift to high light of the red alga *Rhodella violacea* adapted to low irradiance. *Plant Physiol.*, 123(4), 1415-1426.
- Rosenberg, G., & Ramus, J. (1982). Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): Soluble nitrogen and reserve carbohydrates. *Marine Biology*, 66(3): 251-259.
- Santelices, B., & Varela, D. (1993). Intra-clonal variation in the red seaweed *Gracilaria chilensis*. *Marine Biology*, 543-552.
- Schreiber, U., Bilger, W., & Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a non intrusive indicator for rapid assesment of in vivo photosynthesis. *Ecol. Stud.*, 100, 49-70.
- Starr, R., & Ziikus, J. (1993). UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 List of Cultures. *Journal of Phycology*, 1-106.
- Steiner, J. M., Pompe, J. A., & Löffelhardt, W. (2003). Characterization of apcC, the nuclear gene for the phycobilisome core linker polypeptide L(c) (7.8) from the glaucocystophyte alga *Cyanophora paradoxa*. Import of the precursor into isolated cyanelles and integration of the mature protein into intact phycob. *Current genetics*, 44(3): 132-137.
- Tamara, S., Hoek, M., Scheltema, R. A., Leney, A. C., & Heck, A. J. (2019). A Colorful Pallet of B-Phycocerythrin Proteoforms Exposed by a Multimodal Mass Spectrometry. *Approach. Chem*, 5(5), 1302–1317.
- Teo, S.-s., Ho, C.-l., Teoh, S., Lee, W.-w., Tee, J.-M., Rahim, R. A., & Phang, S.-m. (2007). Analyses of expressed sequence tags from an agarophyte, *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rodhophyta). *European Journal Phycology*, 42(1): 41-46.
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., & Scheible, W.-R. (2008). Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, 20(7), 1736-1737.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034.

Vásquez-Suárez, A., Lobos-González, F., Cronshaw, A., Sepúlveda-Ugarte, J., Figueroa, M., Dagnino-Leone, J., . . . Martínez-Oyanedel, J. (2018). The γ 33 subunit of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis* has a typical double linked phycourobilin similar to γ subunit. *PLoS One.*, 13(4), e0195656.

Vorphal, M. A., Bruna, C., Wandersleben, T., Dagnino Leone, J., Lobos González, F., Uribe, E., . . . Bunster, M. (2017). Molecular and functional characterization of ferredoxin NADP(H) oxidoreductase from *Gracilaria chilensis* and its complex with ferredoxin. *Biol. Res.*, 50, 39.

Wang, L., Wang, S., Fu, X., & Sun, L. (2015). Characteristics of an R-phycoerythrin with two γ subunits prepared from red macroalga *Polysiphonia urceolata*. *PLoS One.*, 10(3), e0120333.

Xiangyu, G., Song, Q., Fangqing, Z., Xiaowen, Z., & Xuexi, T. (2007). Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: divergence and evolution. *International Journal of Biological Sciences*, 434-444.

Yi, Z. W., Huang, H., Kuang, T. Y., & Sui, S. F. (2005). Three-dimensional architecture of phycobilisomes from *Nostoc flagelliforme* revealed by single particle electron microscopy. *FEBS Letters*, 579(17): 3569-3573.

Zhang, J., Ma, J., Liu, D., Qin, S., Sun, S., Zhao, . . . Sui, S.-F. (2017). Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Nature*, 551(7678): 57-63.

12 Apéndices

12.1 Mezcla y Programa de Amplificación por qPCR para el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix (Agilent).

12.1.1 Tabla de reacción para la amplificación

	1 reacción
2× <i>Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix</i> (µl)	6,25
<i>Reference Dye</i> 30 nM (µl)	0,2
Partidor Sentido 10 µM, 500 nM final (µl)	0,625
Partidor Antisentido 10 µM, 500 nM final (µl)	0,625
Templado (µl)	2
Agua libre de nucleasas (µl)	2,8
Volumen final (µl)	12,5

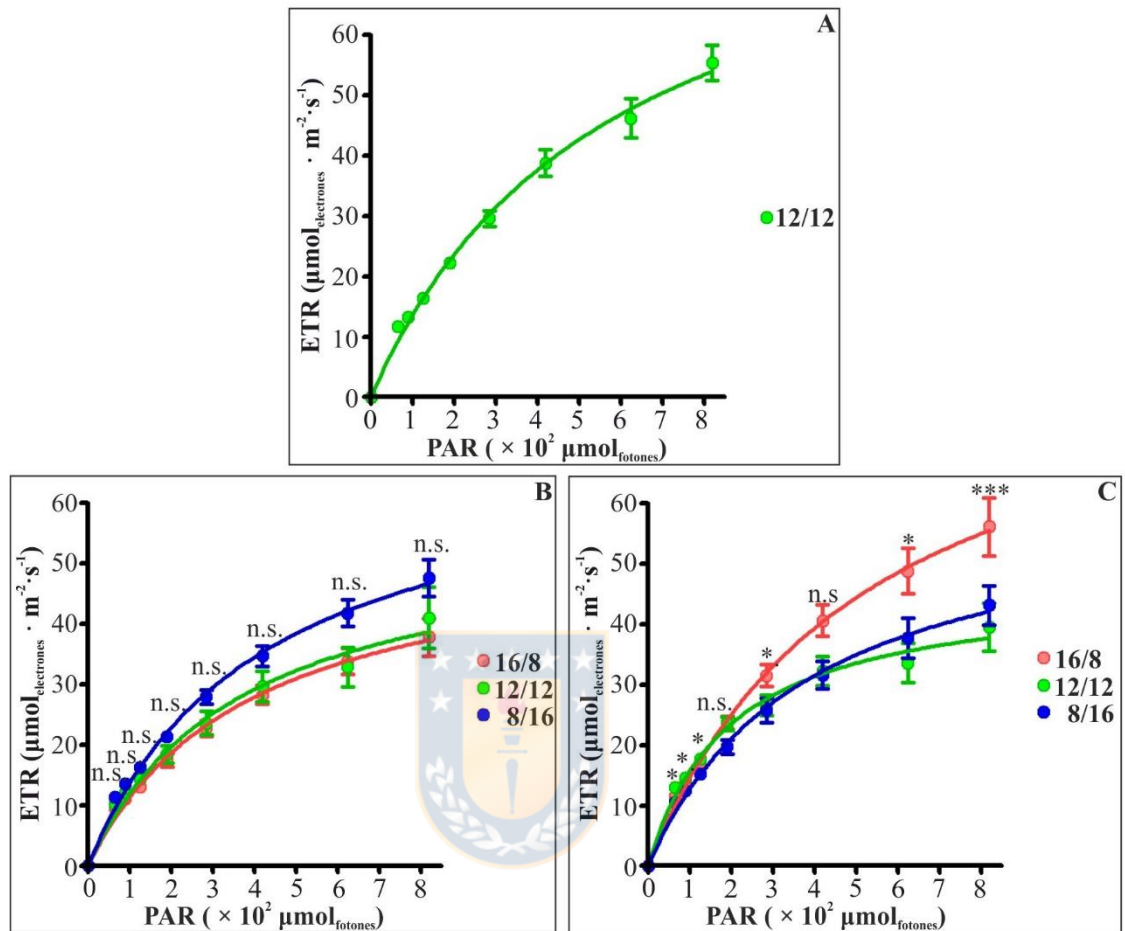
12.1.2 Programa de amplificación



Temperatura	Tiempo	
95°C	3 min	
95°C	30 s	40 ciclos
60°C	15 s	
72°C	15 s	
95°C	20 s	
55°C	30 s	
95°C	30 s	

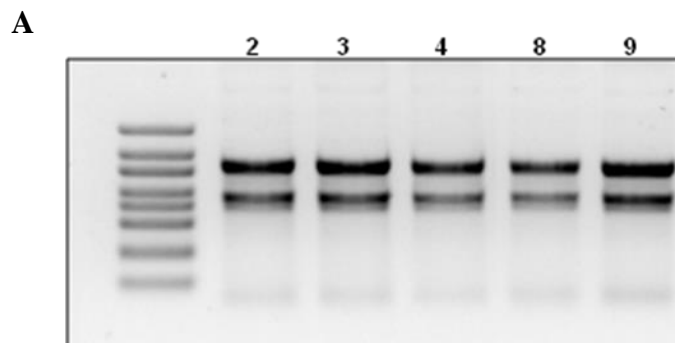
Las lecturas de fluorescencia (Sybr-Green y *Reference Dye*) fueron realizadas en durante la etapa de *annealing* a 60°C y durante la etapa de desnaturalización entre 55°C y 95°C.

12.2 Curvas de fotosíntesis versus irradiancia en respuesta a la aclimatación a los diferentes fotoperiodos



Curvas de respuesta a radiación fotosintéticamente activa (PAR) en el rango desde 0 a 900 μmoles de fotones sobre muestras de individuos aclimatadas a los fotoperiodos control (12/12), verano (16/8) e invierno (8/16) (horas de luz/horas de oscuridad). Cada punto en la curva corresponde al promedio de la tasa de transporte de electrones (ETR) de las determinaciones sobre las muestras ($N = 10$), sometidas previamente a condiciones de oscuridad. **A:** Determinaciones realizadas sobre muestras a 0 días de cultivo *in vitro*. **B:** Determinaciones realizadas sobre muestras a 8 días de cultivo *in vitro*. **C:** Determinaciones realizadas sobre muestras a 12 días de cultivo *in vitro*. Las barras de error corresponden al error estándar sobre el promedio (SEM). La diferencia de los promedios de ETR entre las condiciones de aclimatación a fotoperiodos fue analizada mediante una prueba ANOVA de una vía (n.s.: no significativo, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). Fuente: Elaboración propia.

12.3 Análisis de los RNA totales extraído desde las muestras seleccionadas para secuenciación masiva de RNA (RNA-seq).



B

Muestra	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentración (ng/μl)	RIN	25S/18S
2	2,12	2,22	573	9	1,8
3	2,12	2,3	508	9,3	1,6
4	2,12	2,29	489	9,5	1,6
8	2,19	1,96	386	9,6	1,8
9	2,13	2,41	560	9	1,6

A. Electroforeiss en Gel de Agarosa al 1% de las muestras seleccionadas. El primer carril corresponde al estándar de RNA *RiboRuler High Range RNA Ladder Ready-to-Use* (SM1823, Thermo Scientific), que posee bandas de 6.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 y 200 nt de 120 ng cada una. La integridad de las muestras 2, 3, 4 8 y 9 se aprecia por la presencia de dos bandas carcteristicas características de los RNA ribosomales celulare 25S (3.500 nt) y 18S (1.900 nt) y de los RNA ribosomales cloroplastidiales 23S (2.900 nt) y 16S (1500 nt, sombra de la banda 18S). Además, se aprecia la banda correspondiente a los RNA ribosomales 5-5,8S (120 y 160 nt).

B. Caracterización de la calidad de las muestras de RNA. Como se indica en Métodos 6.5. RIN: Número de Integridad del RNA. 25S/18S: Relación de la intensidad de las bandas de las subunidades ribosomales.

12.4 Secuencias nucleotídicas seleccionadas para análisis comparativo mediante qRT-PCR.

Nombre del gen	Secuencia 5'→3'	Contig contenedor
apcF	ATGCAAGACGCTATTACTACAATTTTAAATCGATAT GATTTAACAGGAAAATATTTAGATAGTATAGCAAT AGAAGAATTGAATAATTATTTTATTAGTGCTTCAA TAGAATTAAGCCATAGAAGTTATTAACCGTCAAG CTTCTAAAATAATTAAAGAGGCTGCTGCACGACTAT ATGAAGAACAACCTGAACTTTTAAGGCCTGGCGGG AATTCCTATACAACCTAGAAGATATGCTGCTTGCTTA CGAGATATTGAATACTACTTAAGATATGCCAGTTAT GCAATAGTTGCAGCAGATACTAATATTTTAAAAGA ACGGGTATTGGATGGATTACAAGATGTATATAATTC ACTGAATGTTCTATTGCACCTACTATTAGAAGCAT TAAGCTTTTACAAGAAGTAATAGAAGCAGAAATGA AATTACAAAATATTGATGCAATAAATTGGGTGTTG AACCATTTCAATATATAATTA AAAACTTAAGCGAA GAAGATATCTAA	SUBUNIDAD β18 DE CORE
γ31	ATGATCGCCTTCGCACCGTCCACTGCGCTTACGTCTG GCTCGAGTGGCCACTTCTGGCAGCTCATTACGACA AACGTTCCGTGTGTATCGCCCAGCCGTAGACCGCA CAATGCCCTACAATGGCGCTACGTTCGATCGCTCGT AAAGCCAACCTGGGACAACCGGCACTTCCTATGGCG GAGCTGCCACAATTCTAAATATGGCTGATGGATAT ATGGCTAAGTCTGTGCTCAATCAATACCTCAACATA TCTCAACCAACTGGTGTATTTATGGTGTGCAGTGCGCA GAAGGTTCCGTTTCAGGGTGCTGCCGATGCTACCAG AGTCCGGGCTCTCAGCAATCGCTTCCGGGCAAAGC AAGCGAGTCCGGCGAAGAAGTACGGTGATTTGTAT GAAAATCGCAAGAACGCCGTCTTAGCCGACCATAT TTGCCAATACGAGGAGTCCTTGTTACCAAGTACCC AAAGCTTTCCAGCACTTACAATCTCGCTCGCAGTGA GGCTTACGGTACATGCATTTCGTTATGCAACCCCGGA AAGCGTTCAGGAAGCAGCAATGATGCGTTATATGG ACATTCAACAGAACATCGCTGCAAATCCCACCGGC GTGTACAATTCGTCTGCAACGAGGGGACCGTCAG AGGCCAAGCGGAACAACCTTCGCGTCTGCTGCATTGA ACGTTGCCTACCGAAACGCGCAGAAGCCAATTGGC CAAATTATGAACGAAAGATAACCAGCAGAAGAAGTA TGGATATAACATGTGCCATGGATGCACTTATGAGG AGTCTCTCGTCAGCAAGTACCCCGCTATTGGCGCCG CTTCCGTCAGAAGTCGTACGGATACTGA	4366
γ33	ATGGAAGCCCCGCTTTTGCTGTCAATGGAATGTTCTCG GCCGTCAAGGTCCGCACGTCTTCCTTCACTGCCAACAAT GTGTCACCTCGCACCGGCACCGCTTCTCCGCCAGCCGTC	902

	<p>ACCATGGCGGTTCGACGCCTTCCAGAAGAAGTTTCAGAG CTTTGGAAAAATCAACATTGACTACTCGCGCCCGAAGAA ACTAGCCTCCTTCAAGCGAGCAGGCTACCCAGTCAGCTT TGACTACCCCAACTCCCCGCCATGGCCGGGCACTACTC AATCTCCAAGTGAATGTACCCAGCGCGTGCGACAAAAT TTTCATGAAGTACGACGAGTACTGCGCAAAGGAATGA TGCAAGTGTTCAAGCGTTCGGCTGTTCCATTTCGGTACCT ACACCACCAAGTGCACCGAGGGCACCGTTCGCGAGCAA GCGTTTGCGAAGCGCGTGTTCACCGTACCAAGGCATTC CGTCAGGCGCAGAAGCCAATTAACGTACGTCTCGCCGA GCGTTATGAAAACCGACGTCTTGCTTTCCTACTATGGCCAA CGGCTGTACAGAGAGGAGCAGCAATTCTCGACAATGC CCATGTCAGCCGCCACCTACCTTGCGGGCCGCGCCGAGG CCATGGGAACCTGCTACAGAGTAGTTACTCCAACCTCGA TTGCTGAGGACTACATGGCAGCCGGTGTGCGCGCGCAG ATCACTGCCAAGGCCATCCGTTCGGGCGTTTACCGCGTG GGTGTGTGCGAGGACGGCTACGCGAAGGGTGATGCCGA AAACCTCCGTGTTGCCGCTTTGGCAGCTGAGTTCCGTGC CGGGCAGCAGTCTCCTAGTACCGTAACCGGTCAGCAGTA TGAGTCTGCCCACGGCTCGCAAGCTGTACGCTAGCAC TTGCCATCACGAAGAGACTCAAATCTTCGCGTACCCTGC CGTTGCAGCCGCCATGTGCCGCGACTGA</p>	
apcC	<p>ATGTTCCTTTTGCATCAGCGACGCCTCTACCGGCCC GCGTCGCCACACACGCCGCGTCTGTGCGCCGCTCGC CGAAGATGTCGTATGACATGGATGGAAGCGGAAGG GGTTCATTGGGGACCTTCGCATTAAGAGCTCAGCC GTTGAGAAGGATTCTCGTTCCTTCAAGGTCACCTAT GTGCAACCGAGCGAAACCAGACTCTTTACATTCCG CGAGTTGCAAAAATGTTTACACTACCAAGGTTGTGCC GTTTTCATCTTGGTATGCTGAACAGCAGCGTATCCA AAAGATGGGCGGTCGTATTCTGAATGTTGAGCTCTC TTCGGGCGGCCAGATGAGGTCAGTGGGAAACACCT AA</p>	2239