

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**



**“COMPARACIÓN DE TRANSCRIPTOMA GLOBAL DE
Macrocystis pyrifera (Laminariales) EN LA ZONA
INTERMAREAL Y SUBMAREAL. SAN JUAN DE
MARCONA. ICA. PERÚ”**

Presentada por:

ERIKA ALEXANDRA SALAVARRÍA PALMA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE *DOCTORIS PHILOSOPHIAE*
EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**

Lima - Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

**“COMPARACIÓN DE TRANSCRIPTOMA GLOBAL DE
Macrocystis pyrifera (Laminariales) EN LA ZONA
INTERMAREAL Y SUBMAREAL. SAN JUAN DE
MARCONA. ICA. PERÚ”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
Doctoris Philosophiae (Ph.D.)**

Presentada por:

ERIKA ALEXANDRA SALAVARRÍA PALMA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Rosa Espejo Joya
PRESIDENTE

Ph.D. Gretty Villena Chávez
PATROCINADORA

Dra. Patricia Gil Kodaka
CO-PATROCINADORA

Dra. Doris Zúñiga Dávila
MIEMBRO

Dra. Ilanit Samolski Klein
MIEMBRO

Ph.D. Natalia Cristina Arakaki Makishi
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A Adán⁺ y Rosa⁺, mis padres

A Gabriel y Eduardo, mis hijos

A Gabriel Marcel Gutiérrez Correa Ph.D⁺, mi mentor

AGRADECIMIENTO

A mi familia por su constante preocupación.

A Marcel Gutiérrez Correa, Ph.D⁺. quien me enseñó a ver la investigación con otro enfoque.

A Gretty Villena Chávez, Ph.D. y Patricia Gil Kodaka, Ph.D por su colaboración y guía.

A Sujay Paul, Ph.D por su valiosa orientación. Muchas gracias.

A la Dra. Dora Arvizú. A Rosa Espejo Joya, Ph.D., Ilanit Samolsky Klein, Ph.D. y Dra. Nancy Rojas por sus apreciables criterios científicos.

A mis compañeros de laboratorio de Micología y Biotecnología LMB de la Universidad Nacional La Molina UNALM.

Al Ing. Gunter Villena Sarmiento y Biol. Juan Diego Dupuy de Peruvian Seaweeds PSW.

Gracias a las instituciones como la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT - Ecuador. Programa “Academia 2010”, Universidad Estatal Península de Santa Elena UPSE, Peruvian Seaweeds PSW, al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad INNOVATE-PERÚ y a la Universidad Nacional Agraria La Molina.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Objetivo general.....	7
1.2.	Objetivos específicos	7
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1.	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C. AGARDH 1820.	8
2.1.1.	La función de <i>Macrocystis pyrifera</i> en el ecosistema marino.....	9
2.1.2.	La transcriptómica y el estudio de la macroalgas marinas	10
2.1.3.	Zona intermareal.....	13
2.2.	Metabolismo en algas pardas.	14
2.2.1.	Almacenamiento de Carbono	14
2.2.2.	Mecanismos de Concentración de Carbono MCC	15
2.3.	Metabolismo Primario.	17
2.3.1.	Fotosíntesis (Ciclo Calvin-Benson).....	17
2.4.	Metabolismo Secundario.	22
2.4.1.	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	22
2.4.2.	Haloperoxidasas: <i>Vanadium Dependent Bromoperoxidase</i>	23
2.5.	Defensas químicas de algas pardas.	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1.	Área de estudio.	29
3.1.1.	Muestreo	29
3.1.2.	Condiciones experimentales	36
3.1.3.	Preparación de las muestras.....	36
3.2.	Transcriptómica	37
3.2.1.	Extracción de ARN.....	37

3.2.3.	Purificación de ARN	38
3.2.4.	Síntesis de ADNc por Transcripción reversa	39
3.2.5.	<i>RNAseq</i> ensamblaje del Transcriptoma <i>de novo</i>	42
3.2.6.	Diseño de <i>Primers</i> RT-PCR en Tiempo Real.....	44
3.3.	Análisis Bioinformáticos	44
3.3.1.	Software para el diseño de los <i>primers</i> para PCR en Tiempo Real:.....	44
3.3.2.	Software para los análisis de RNA <i>seq</i> :.....	45
3.3.3.	Análisis diferencial de genes mediante PCR Tiempo Real	47
3.3.4.	<i>Gene ontology GO</i>	47
3.4.	Patrones de expresión: Expresión diferencial significativa	48
3.4.1.	<i>Heatmap</i> o Mapa de calor.....	48
3.5.	Análisis químico del agua de mar.....	48
3.5.1.	Muestreo del agua de mar.....	48
3.5.2.	Conductividad, salinidad, temperatura y pH	49
3.5.3.	Determinación de nitritos	49
3.5.4.	Determinación de nitrato	50
3.5.5.	Determinación de fosfato.....	50
3.6.	Análisis físico químico	51
3.6.1.	Procesamiento de las muestras	51
3.6.2.	Extracción de alginato de sodio.....	52
3.6.3.	Cálculo del rendimiento de biomasa y gel de alginato de sodio	53
3.6.4.	Viscosidad del alginato de sodio	53
3.7.	Análisis estadísticos	53
3.8.	Análisis de microscopia	54
3.8.1.	Microscopia de alta resolución en campo claro.....	54
3.8.2.	Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	55
3.8.3.	Microanálisis de Dispersión de Energía EDX.....	55

IV. RESULTADOS	56
4.1. Transcriptómica	56
4.1.1. Extracción de ARN.....	56
4.1.2. Síntesis de ADNc por Transcripción reversa	58
4.1.3. Diseño de <i>Primers</i> para PCR en Tiempo Real	59
4.1.4. RNAseq ensamblaje del Transcriptoma <i>de novo</i>	59
4.1.5. Anotación funcional de unigenes	61
4.1.6. Genes expresados diferencialmente.....	68
4.1.7. Análisis de enriquecimiento funcional <i>GO</i> y vías <i>KEGG</i>	69
4.2. Patrones de expresión: Expresión diferencial significativa	70
4.2.1. <i>Heat map</i> o mapa de calor	72
4.3. Análisis químico del agua de mar.....	74
4.4. Análisis físico químico	75
4.4.1. Cálculo del rendimiento promedio de biomasa y gel de alginato de sodio ...	75
4.4.2. Viscosidad del alginato de sodio	76
4.5. Análisis estadísticos	77
4.6. Análisis de microscopía	79
4.6.1. Microscopia de alta resolución en campo claro.....	79
4.6.2. Microscopia Electrónica de Barrido MEB	81
4.6.3. Microanálisis de Dispersión de Energía EDX.....	83
V. DISCUSIÓN.....	85
5.1. Análisis transcriptómicos.....	85
5.2. Metabolismo primario.....	86
5.3. Metabolismo antioxidante.....	90
5.4. Mecanismos de transportación.....	94
5.6. Aprataxina.....	95
VI. CONCLUSIONES.....	98

VII. RECOMENDACIONES	100
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
IX. ANEXOS	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis trascríptomícos en Phaeophyceae.....	12
Tabla 2. Medición de la concentración y pureza en las muestras de ARN de <i>Macrocystis pyrifera</i> , extraídas para los análisis de <i>PCRq</i> , usando el espectrofotómetro Nanodrop.....	57
Tabla 3. Medición de la concentración y pureza en las muestras de ARN de <i>Macrocystis pyrifera</i> , usando el espectrofotómetro <i>Nanodrop</i> . Laboratorio <i>Genotypic</i> . India.	57
Tabla 4. Preparación de las librerías para el transcriptoma global de <i>Macrocystis pyrifera</i> Laboratorios <i>Genotypic</i> . India.	58
Tabla 5. Resumen del ensamblaje de novo de <i>Macrocystis pyrifera</i> , tratamientos 0 m (T2A) y 10 m (T2B), empleando la herramienta <i>Trinity</i>	60
Tabla 6. Resumen del análisis COG de <i>Macrocystis pyrifera</i> en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2B) empleando las herramientas <i>Trinity</i> más <i>Cdhit</i>	61
Tabla 7. Resumen de genes expresados diferencialmente durante la desecación en <i>Macrocystis pyrifera</i> en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2B). Anotación funcional de unigenes.	68
Tabla 8. Análisis químico del agua de mar.....	74
Tabla 9. Análisis químico proximal: Cálculo del rendimiento de biomasa de <i>Macrocystis pyrifera</i>	75
Tabla 10. Análisis físico químico: Cálculo del rendimiento promedio del alginato de sodio de <i>Macrocystis pyrifera</i>	76
Tabla 11. Análisis físico químico: Porcentaje de reducción de viscosidad del alginato de sodio de <i>Macrocystis pyrifera</i>	77

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de flujo para la preparación de las librerías de las muestras de ARN de *Macrocystis pyrifera* para el análisis de RNAseq. Fuente: Laboratorios *Genotypic* (India). 41
- Figura 2.** RNAseq ensamblaje del Transcriptoma de novo de *Macrocystis pyrifera*: Procesos empleados para el análisis DESeq para los tratamientos 0 m (T2A) y 10 m (T2B). Fuente: Laboratorios *Genotypic*. (India). 43
- Figura 3.** Diagrama de flujo que ilustra los diferentes software empleados para el análisis transcriptómico global de *Macrocystis pyrifera* en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2 B). Fuente: Laboratorios *Genotypic*. (India). 46
- Figura 4.** Clasificación *Gene Ontology* GO de unigenes del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera* a 10 m (T2B) de profundidad. 63
- Figura 5.** Representación gráfica del *Gene Ontology* GO de *M. pyrifera* que ilustra la Función molecular, Procesos biológicos y Componentes celulares. Condición T2A (0 m).
- Figura 6.** Representación gráfica del *Gene Ontology* GO de *M. pyrifera* que ilustra la Función molecular, Procesos biológicos y Componentes celulares. Condición T2B (10 m).
- Figura 7.** Distribución de los procesos metabólicos, fisiológicos y estructurales a nivel celular y molecular del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera*: Condición 0 m. ... 65
- Figura 8.** Distribución de los procesos metabólicos, fisiológicos y estructurales a nivel celular y molecular del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera*: Condición 10 m. .. 66
- Figura 9.** Comparación de las categorías funcionales y el número de *contigs* del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera* a 0 m y 10 m. La figura muestra el número de *contigs* bajo-regulados a la izquierda y sobre-regulados a la derecha en cada categoría funcional. $FDR \leq 0.05$ 67

Figura 10. *Volcano plot* de los genes de *Macrocystis pyrifera*, expresados diferencialmente en las condiciones de 0 metros (T2A) y 10 metros (T2B). El color verde muestra la expresión de los genes, considerando su fold change. El color naranja representa los genes expresados neutralmente..... 71

Figura 11. *Heat map* o agrupación jerárquica de los genes de *Macrocystis pyrifera*, expresados diferencialmente en las condiciones de 0 metros (T2A) y 10 metros (T2B). El color rojo muestra alta expresión y el color verde muestra baja expresión. La intensidad del color representa el \log_2 73

Figura 12. A la izquierda del texto se presentan muestras de *M. pyrifera* en: Frondas, pulverizada, alginato de calcio y alginato de sodio puro. A la derecha: Fiolas con alginato de sodio extraído de *M. pyrifera* colectadas a 0 m y 10 m para pruebas de viscosidad; en el centro se observa el control (muestra comercial). 77

Figura 13. Análisis estadísticos de los rendimientos de la biomasa obtenida de *Macrocystis pyrifera* a 0 m y 10 m. A) Homogeneidad de varianzas ($R = 0.96$). B) Normalidad de los residuales. C) Análisis con LSD Fisher (ANOVA, $\alpha = 0.05$). 79

Figura 14. Comparación de la Microscopia de Alta Resolución en Campo Claro del filoide de *Macrocystis pyrifera*: Zona cortical. A) – B) Observación de la pared celular, parénquima y zona cortical de un corte transversal del filoide colectado a 0 m (T2A), nótese las células parenquimatosas vacías. C) - D) Observación de la pared celular, parénquima y zona cortical del filoide colectado a 10 m (T2B), se observa la presencia de polisacáridos de pared. Escala 10.0 μm . Flechas rojas indican células con ausencia o presencia de polisacáridos de pared.....

Figura 15. Comparación de la Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de los polisacáridos de pared de *Macrocystis pyrifera*, condición 0 m (T2A) y 10 m (T2B). A) Observación MEB de la pared celular, parénquima y zona cortical de un corte transversal del filoide colectado a 0 m, nótese las células meristemáticas vacías. B) Observación MEB de la pared celular, parénquima y zona cortical del filoide colectado a 10 m, se observa la presencia de polisacáridos de pared a manera de estructuras trabeculares. C) y D) Magnificación 2600x para ambas condiciones. Vista detallada de los polisacáridos de

pared a manera de láminas. Barras en las figuras A) – D) corresponden a la escalas a 5.0 μm . Flechas rojas indican las regiones seleccionados para el análisis EDX.82

Figura 16. Comparación del análisis de EDX. Espectros de polisacárido a partir de los filoides de la pared celular y parénquima de *Macrocystis pyrifera*. Las regiones analizadas son las estructuras trabeculares de las zonas corticales observadas por MEB. Los picos de azufre (S) y sodio (Na), de ambas condiciones 0 m y 10 m, fueron obtenidos por los conteos de fotones. Pared celular: **A)** 0 m. S ($K\alpha= 2.0 \text{ KeV}$), Na ($K\alpha= 1.0 \text{ KeV}$) **B)** 10 m. S ($K\alpha= 2.4 \text{ KeV}$), Na ($K\alpha= 1.2 \text{ KeV}$). Parenquima: **C)** 0 m. S ($K\alpha= 2. 1 \text{ KeV}$), Na ($K\alpha= 0.9 \text{ KeV}$). **D)** 10 m. S ($K\alpha= 2.5 \text{ KeV}$), Na ($K\alpha= 1.3 \text{ KeV}$).

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Mapa con la ubicación geográfica de la localidad de muestreo de <i>Macrocystis pyrifera</i> . Escala 1:2'500.000	146
ANEXO 2. Análisis de microscopía: Microanálisis de Dispersión de Energía EDX en <i>Macrocystis pyrifera</i> . Lecturas en muestras a 0 m de la superficie (T2A).....	147
ANEXO 3. Análisis de microscopía: Microanálisis de Dispersión de Energía EDX en <i>Macrocystis pyrifera</i> . Lecturas en muestras a 10 m de la superficie (T2B).....	148
ANEXO 4. <i>Primers</i> para validación de genes del transcriptoma global de <i>Macrocystis pyrifera</i> en PCR en Tiempo Real.	149
ANEXO 5. Listado de genes con expresión significativamente diferenciales en <i>Macrocystis pyrifera</i> a 0 m (T2A) y T2B (10 m).....	151

LISTADO DE ABREVIATURAS

pb	Pares de bases
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Blastn	Blast de nucleótidos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cl‰	Clorinidad
cm	Centímetro
JCVI	Instituto J. Craig Venter
m	Metro
ppt	Partes por mil
PSII	Fotosistema II
qPCR	Reacción en Cadena de polimerasa Cuantitativa
S‰	Salinidad
Oz	Onza
kg.	Kilogramos
g.	Gramos
cP	Centipoise
ups	Unidades Practicas de Salinidad (<i>Practical Salinity Units</i>)
w/v	Peso/volumen
min	Minuto
Wt	Peso atómico (<i>Atomic Weight</i>)

RESUMEN

La transcriptómica de macroalgas pardas para el estudio comparativo de los genes involucrados en su regulación bajo condiciones naturales de inmersión y emersión por efecto de las mareas, ha sido escasamente investigada. Debido a la importancia económica de *Macrocystis pyrifera* se caracterizó su transcriptoma global, mediante tecnología RNA seq (Illumina NextSeq 500), e identificó los genes que se expresan durante el estrés abiótico en condiciones intermareal y submareal para el análisis del mapa transcriptómico y las respuestas adaptativas frente a cambios tan variables de su entorno natural. Al mismo tiempo, para relacionar las variables ambientales, se realizó el análisis químico de las muestras de agua de mar colectadas en el área de estudio a 0 m (T2A) y 10 m de profundidad (T2B) o condición control. Se realizó análisis químicos proximales, como el rendimiento de la biomasa y gel de alginato de sodio extraído de plantas enteras de *Macrocystis pyrifera*, colectadas en San Juan de Marcona, centro de Perú; así como también se realizó pruebas de viscosidad para ambas profundidades. Además se realizaron análisis en Microcopia Electrónica de Barrido MEB en las muestras de las frondas colectadas para los estudios transcriptómicos y microanálisis de dispersión de energía EDX.

El análisis de RNA-seq produjo 101,468 unigenes no redundantes con un promedio de 827pb. Se identificaron 30,559 transcritos funcionales con regiones codificantes (30.1%). Los transcritos fueron anotados usando la base de datos de NCBI y el programa BLAST 2.2.31, mediante la comparación con las secuencias de proteínas conocidas del alga parda *Ectocarpus siliculosus* con un E value $<10^{-5}$ se obtuvo 96,997 unigenes. Se identificaron 34 unigenes para la síntesis de polisacáridos de pared. El análisis de ontología de genes identificó 9,331 genes y 8,429 unigenes involucrados en 50 vías metabólicas conocidas.

Basado en los valores obtenidos de la lectura por kilobase por millón (RPKM), se determinaron 9,519 (9.4%) unigenes expresados diferencialmente entre los tratamientos de 0 metros y 10 metros de profundidad; estos incluían 4,556 unigenes inducidos y 4,963 unigenes reprimidos, sugiriendo que existe expresión diferencial de genes asociados a condiciones de desecación.

Al realizar la caracterización del perfil transcriptómico de *M. pyrifera* la respuesta, durante la desecación, consistió en la activación de las proteínas de tolerancia al estrés térmico; por ejemplo *Heat shock protein* (Hsp 70) y la represión de las vías de síntesis de acuaporinas. Al mismo tiempo, indujo una respuesta diferencial en los procesos de biosíntesis de polisacáridos de pared como el alginato; activó los sistemas de desintoxicación ROS como el Vanadio dependiente bromoperoxidasa y procesos metabólicos primarios como la producción de Piruvato fotosintético. Finalmente, observamos la presencia de importantes vías como L-ascorbato (*Smirnoff-Wheeler pathway*), síntesis de Aprataxina, fitohormonas y la represión de genes implicados en la asimilación de nitrógeno.

Los análisis de la calidad de agua de mar coincidieron con los resultados obtenidos a nivel molecular y permitieron comparar información importante para comprender mejor la respuesta de *M. pyrifera* frente a condiciones de estrés. Los análisis químicos proximales, reportó mayor rendimiento del gel de alginato de sodio en el tratamiento T2B, esto concuerda con el perfil transcripcional de *M. pyrifera* en la condición de 10 metros de profundidad (T2B) en donde se halla una sobre expresión de los genes para la síntesis de alginatos. Al comparar la viscosidad de una muestra comercial de alginato de sodio marca Sigma-Aldrich^R con el tratamiento T2B, los resultados del alginato de sodio del Perú tienen una calidad equivalente al 50% en relación al alginato comercial, a una concentración del 70%. En los análisis de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de las muestras colectadas a 10 metros (T2B) se observó la presencia de polisacáridos en las paredes celulares, a manera de estructuras esponjosas. Los análisis de EDX, indican mayor porcentaje en la composición atómica y peso de elementos como carbono (C) en la pared celular, en relación al parénquima, en la condición T2B.

El mapa transcriptómico *de novo* de *M. pyrifera* evidenció una amplia respuesta adaptativa frente a cambios tan variables a su entorno natural. Consecuentemente, *M. pyrifera*, presentó una gran capacidad de tolerancia a los efectos del estrés abiótico. La presencia de polisacáridos de pared, como el alginato de sodio, presentó un rol importante en la regulación iónica para la adaptación de *Macrocystis* al estrés por efecto de la desecación y en la respuesta al estrés en general.

Palabras claves: *Macrocystis pyrifera*, RNA seq, Mapa Transcriptómico, Estrés abiótico.

ABSTRACT

The transcriptomics of brown macroalgae for the comparative study of the genes involved in their regulation under natural conditions of immersion and emersion by the effect of the tides has been scarcely investigated. Due to the economic importance of *Macrocystis pyrifera*, its global transcriptome was characterized, using RNA seq technology (Illumina NextSeq 500), and identified the genes that are expressed during abiotic stress in intertidal and subtidal conditions for transcriptomic map analysis and adaptive responses in the face of such variable changes in its natural environment. At the same time, to relate the environmental variables, the chemical analysis of the seawater samples collected in the study area was carried out at 0 m (T2A) and 10 m deep (T2B) or control condition. Proximal chemical analyzes were carried out, such as biomass yield and sodium alginate gel extracted from whole plants of *Macrocystis pyrifera*, collected in San Juan de Marcona, central Peru; as well as viscosity tests were carried out for both depths. In addition, scanning electron microbial MEB analyzes were performed on the samples of the fronds collected for transcriptomic studies and EDX energy dispersion microanalysis.

The analysis of RNA-seq produced 101,468 non-redundant unigenes with an average of 827 bp. 30,559 functional transcripts with coding regions (30.1%) were identified. The transcripts were annotated using the NCBI database and the BLAST program 2.2.31, by comparing with the known protein sequences of the brown algae *Ectocarpus siliculosus* with an E value $<10^{-5}$, 96,997 unigenes were obtained. We identified 34 unigenes for the synthesis of wall polysaccharides.

The gene ontology analysis identified 9,331 genes and 8,429 unigenes involved in 50 known metabolic pathways. Based on the values obtained from the reading per kilobase per million (RPKM), 9,519 (9.4%) unigenes differentially expressed between the treatments of 0 meters and 10 meters deep were determined; these included 4,556 induced

unigenes and 4,963 repressed unigenes, suggesting that there is differential expression of genes associated with dry conditions.

When carrying out the characterization of the transcriptomic profile of *M. pyrifera*, the response, during the desiccation, consisted in the activation of the thermal stress tolerance proteins; for example Heat shock protein (Hsp 90) and repression of aquaporin synthesis pathways. At the same time, it induced a differential response in the biosynthesis processes of wall polysaccharides such as alginate; Activated ROS detoxification systems such as the Vanadium-dependent bromoperoxidase and primary metabolic processes such as the production of photosynthetic pyruvate. Finally, we observed the presence of important pathways such as L-ascorbate (Smirnoff-Wheeler pathway), synthesis of Aprataxin, phytohormones and the repression of genes involved in the assimilation of nitrogen.

Seawater quality analyzes coincided with the results obtained at the molecular level and allowed comparing important information to better understand the response of *M. pyrifera* to stress conditions. The proximal chemical analyzes reported higher performance of the sodium alginate gel in the T2B treatment, this agrees with the transcriptional profile of *M. pyrifera* in the condition of 10 meters of depth (T2B) where there is an over expression of the genes for the synthesis of alginates. When comparing the viscosity of a commercial sample of Sigma-Aldrich® brand sodium alginate with the T2B treatment, the results of the Peruvian alginate have a quality equivalent to 50% in relation to the commercial alginate, at a concentration of 70%. In the Scanning Electron Microscopy (SEM) analyzes of the samples collected at 10 meters (T2B), the presence of polysaccharides was observed in the cell walls, in the form of spongy structures. The EDX analyzes indicate a higher percentage of the atomic composition and weight of elements such as carbon (C) in the cell wall, in relation to the parenchyma, in the T2B condition.

The *de novo* transcriptomic map of *M. pyrifera* showed a wide adaptive response to changes so variable in its natural environment. Consequently, *M. pyrifera* presented a great capacity for tolerance to the effects of abiotic stress. The presence of wall polysaccharides, such as sodium alginate, presented an important role in the ionic regulation for the

adaptation of *Macrocystis* to stress due to the effect of drying and in the response to stress in general.

Keywords: *Macrocystis pyrifera*, RNA seq, Transcriptome map, Abiotic stress.

I. INTRODUCCIÓN

La distribución geográfica de *Macrocystis pyrifera* Agardh (1820) ha sido reportada principalmente a lo largo de las costas del Pacífico de América del Norte (México, Norte de Baja California y Alaska) y América del Sur (Perú hasta Cabo de Hornos) (Alveal, 1995), en Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda (Druehl, 2000). En Chile se distribuye desde Tocopilla (28°S) (Levring, 1960) hasta el Cabo de Hornos (55°S) (Ramírez y Santelices, 1991; Hoffmann y Santelices, 1997; Buschmann et al., 2004), sus poblaciones forman cordones continuos de macroalgas, paralelos a la costa, habitando preferentemente en áreas protegidas y semi protegidas del oleaje desde la zona supralitoral (intermareal) hasta los 30 m de profundidad (submareal) (Lleellish, 2001).

En la zona centro sur del Perú, las grandes algas pardas o *kelp* se encuentran representados por el orden Laminariales con las familias Lessoniaceae y Laminariaceae; en la última década se evalúa la distribución, el estado de las poblaciones y las pesquerías de las principales especies de *kelp* de esta zona (Zavala, 2011). En la familia Laminariaceae, la macroalga parda gigante, *M. pyrifera* se caracteriza por formar densos bosques (Candia et al., 1979; Palacios y Mancilla, 2003) que crecen fijadas al sustrato rocoso mediante un disco de fijación, formando extensos cinturones costeros en el sur de Argentina y Chile (Barrales y Lobban, 1975; Santelices y Ojeda, 1984; Dayton, 1985) constituyendo la mayor reserva mundial de alginatos; alrededor de 25.000 toneladas de ácido algínico se extraen en todo el mundo (Edyvane, 2003). La producción mundial de ácido algínico durante 1991, alcanzó las 27.000 toneladas generando divisas del orden de los US\$ 250 millones anuales (Vásquez, 2009).

El cultivo de algas marinas para la producción de sustancias como ficocoloides destinados a la industria textil, química y alimentaria ha alcanzado un vertiginoso desarrollo a nivel mundial; así como la fabricación de productos alimenticios para consumo directo. También existe una amplia explotación de praderas naturales de las macroalgas para un uso comestible (FAO, 2011). En Perú, *M. pyrifera* es conocida como “sargazo” o “bolita” y constituye el sustento económico de numerosas familias en el litoral peruano; debido a su

creciente demanda en los mercados internacionales para la obtención de materia prima, se ha incrementado su extracción dando lugar a la sobreexplotación del recurso (IMARPE, 2012). La amplia y abundante distribución mundial de *M. pyrifera*, su alta capacidad de crecimiento, la posibilidad de cosechar hasta el 75 por ciento de su biomasa y no afectar sus estructuras reproductivas, su extensa aplicación industrial en las áreas: farmacéutica, papelera, cosmética y cervecera; le han otorgado un importante interés económico y constituye la principal fuente de extracción de alginatos.

Perú figura como proveedor de macroalgas pardas de los principales mercados de destino, en países como: China, Francia, Taiwán, Estados Unidos y Japón. Las presentaciones con las cuales se ha exportado las macroalgas han sido: secas, secas y molidas, micropulverizadas, frescas congeladas; predominando la presentación en seco. El principal mercado para la exportación de las macroalgas en Perú, está dirigido a su uso como materia prima en la industria de alginatos, carragenanos y agar (ADEX, 2008). Por lo tanto *M. pyrifera* constituye un importante recurso para el sustento económico de cientos de familias de pescadores artesanales en el litoral costero peruano.

La clasificación del número de especies pertenecientes al género *Macrocystis* ha sido sujeto de mucha discusión, debido a la alta variabilidad morfológica de los caracteres fenotípicos, utilizados para su clasificación taxonómica; una alta diversidad de formas han sido referidos como ecotipos (Graham et al., 2007; Demes et al., 2009). La clasificación más utilizada incluye cuatro especies: *M. pyrifera*, *M. integrifolia*, *M. angustifolia*, *M. laevis*. Sin embargo, debido a análisis moleculares, el género ha sido unificado en una sola especie (*M. pyrifera*) (Demes et al., 2009; Macaya y Zuccarello 2010; Astorga et al., 2012; Guillemín et al., 2016). Por otra parte, los bosques de *M. pyrifera* son el hábitat, refugio y alimento de una gran diversidad de especies de invertebrados y peces, con reconocida importancia para las comunidades bentónicas; así como, sustrato para otras especies de algas (Plana et al., 2007). Desde el punto de vista económico, en los últimos años las exportaciones de macroalga pardas en el Perú, superan las 10.000 toneladas. Regulaciones Ministeriales en este país, establecen vedas que prohíben la actividad extractiva de macroalgas pardas dada la deficiente recuperación en las poblaciones y extracción de ejemplares adultos.

Las diferencias morfológicas de un género con amplia distribución geográfica, como ocurre con el alga parda *Macrocystis*, pueden alternativamente reflejar una respuesta diferencial a factores ambientales que varían a través del espacio geográfico (Fowler-Walker et al., 2005). Los bosques de algas gigantes o *kelps*, como *Macrocystis integrifolia* (Bori, 1826), están expuestos a diferentes gradientes medioambientales de factores abióticos y bióticos desde la superficie del mar al sustrato inferior. Los estudios han indicado que la irradiación, la temperatura, la salinidad, la sedimentación, la concentración de nutrientes, la acción del oleaje y la cantidad de epífitas adheridas a las frondas; pueden afectar significativamente el crecimiento de los *kelps* (Dean & Jacobsen, 1984; North et al., 1986; Edwards & Hernández-Carmona, 2005). Para estudiar la respuesta al estrés en las algas marinas, se han utilizado compuestos halogenados y micosporinas, estos últimos son pequeños metabolitos secundarios cuya función no solo está limitada a proteger del exceso de radiación UV a los organismos marinos que lo producen; sino también del estrés osmótico, térmico y la desecación (Yuan et al., 2009; La Barre et al., 2010; Kundel et al., 2012).

Por otra parte, a nivel celular la información genética cifrada en el Ácido desoxirribonucleico (ADN) y contenida en los genes, se expresa a través de los mecanismos de transcripción y traducción a partir del cual se producen moléculas de Ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas, respectivamente. Eventos celulares tales como la replicación, la división celular y caracteres macroscópicos como: Rasgos morfológicos, funcionales y de respuesta ante estímulos son producto de la expresión diferencial de genes. En plantas, el control de la respuesta frente a estados de estrés biótico y abiótico está dado por la actividad transcripcional de activación o represión de genes (Proudfoot et al., 2002). La transcripción es un proceso nuclear cuya activación depende de estímulos intra o extracelulares que activan cascadas de señalización para determinar cuáles genes deben expresarse o reprimirse de acuerdo con el tipo de estímulo inicial.

La cantidad de moléculas producidas de determinado ARNm depende de la función que este tenga en un proceso celular específico. Así, cuando se requiera dar respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producirán. De manera similar, bajo ciertas circunstancias particulares hay genes que permanecen reprimidos, pero un estímulo hace que se expresen y se inicia

entonces la transcripción. De esta manera la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcrito, bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen. Más aún los niveles de ARNm pueden dar no solo una visión clara de patrones de expresión, sino también cuantificaciones altamente correlacionadas entre cambios en la abundancia de ARNm con cambios en la abundancia de proteínas (Lockhart y Winzeler, 2000). En conjunto, todos los transcritos derivados de genes que se producen en una célula en un momento y bajo una condición fisiológica determinada se denomina transcriptoma.

La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la implementación de la secuenciación del Ácido desoxirribonucleico copia (ADNc), o más recientemente de la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como RNA-seq (Wang et al., 2009; Garber et al., 2011; Egan et al., 2012; Ward et al., 2012). Esta herramienta transcriptómica cambia la manera de cómo se analizan y comprenden los transcriptomas (Wang et al., 2009). Además, el RNA-seq da una cobertura completa de transcritos, genera información no solo de la secuencia, sino también de la estructura de exones y posibles eventos de *splicing* alternativo (Lister et al., 2009; Gullledge et al., 2012). La información de esta manera puede ser integrada, interpretada y de gran utilidad para vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de expresión.

La tecnología de secuenciamiento RNA-seq, en el poco tiempo que se encuentra disponible, ha desarrollado un grupo relativamente amplio de investigaciones dirigidas a caracterizar y cuantificar transcriptomas; así como a comprender los mecanismos de la variación de la expresión génica (Soto y López, 2012). Las aplicaciones de RNA-seq se han llevado a cabo en especies eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y en el ser humano (Nagalakshmi et al., 2008; Mortazavi et al., 2008; Maher et al., 2009; Pickrell et al., 2010; Gan et al., 2010; Daines et al., 2011; Peng et al., 2012), estas investigaciones demuestran la alta aplicabilidad que el RNAseq ha tenido. Recientemente la tecnología de RNA-seq también se ha implementado para estudios de transcriptomas vegetales. Los estudios de RNA-seq en plantas ha permitido, por ejemplo, la identificación de genes expresados frente a tratamientos de vernalización y respuesta a giberelinas en remolacha azucarera

(Mutasa-Gottgens et al., 2012) y en respuesta a estrés hídrico y al calor (Gulledge et al., 2012). La información generada por RNA-seq también se ha explotado para la identificación de SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) en uva y arroz (Zenoni et al., 2010; Lu et al., 2010) y para la detección de variantes de *splicing* alternativo durante el desarrollo del fruto de uva y en *Arabidopsis* (Zenoni et al., 2010; Gulledge et al., 2012). También se ha constituido en una herramienta fundamental para ayudar en la anotación de genes (Lu et al., 2010). Lo anterior muestra la utilidad y las posibilidades que esta herramienta transcriptómica tiene. Así como, su aplicación bajo diferentes enfoques investigativos.

La investigación en genómica funcional en macroalgas, se encuentra en fase muy inicial, con algunos estudios principalmente referidos a especies de los géneros *Laminaria*, *Ectocarpus* (Roeder et al., 2005; Ditammi et al., 2009; Martins et al., 2013) y único estudio de transcriptómica en *Macrocystis pyrifera* (Konotchick et al., 2012). Dittami et al., 2009 analizaron la expresión global del alga parda *Ectocarpus siliculosus* examinando los cambios transcriptómicos que ocurren durante la aclimatación térmica corta de esta alga a tres condiciones diferentes de estrés abiótico demostrando que casi el 70 por ciento de la expresión de esos genes son regulados como respuesta a por lo menos uno de esos factores estresantes. Martins et al. (2013) realizaron un estudio sobre la expresión de genes ligados al sexo en la alga parda *Fucus vesiculosus* y estimaron que la expresión de los genes fue mayor para los machos con 14 por ciento de genes ortólogos frente a las hembras con nueve por ciento. Respecto a *Macrocystis pyrifera* se ha realizado un primer análisis transcriptómico de la función metabólica frente a variables como el gradiente de profundidad, luz, temperatura y nutrientes en diferentes estaciones del año creando cuatro librerías de ADNc y hallando alta similaridad con otros miembros de las *Phaeophyceae* como son *Ectocarpus siliculosus* y *Laminaria digitata* (Konotchick et al., 2012).

En Perú, pese a que *M. pyrifera* es un recurso económica y socialmente importante, existen trabajos sobre caracteres morfológicos distintivos, distribución geográfica y usos de esta importante macroalga (Acleto, 1986). Sin embargo, no existen estudios de genómica funcional que permitan obtener información básica y necesaria para el manejo sustentable del recurso, teniendo en cuenta su distribución en lugares con condiciones ambientales tan variables como la luz, la temperatura, nutrientes, entre otros factores que pueden provocar

adaptaciones morfológicas dando origen a ecotipos o morfologías distintas de esta macroalga. Consecuentemente, esta investigación, constituye uno de los primeros esfuerzos por generar información biológica útil para el manejo y caracterización del recurso ya que existe escasa información genómica para las macroalgas (Jamers et al., 2009) y en particular para las *Phaeophyceae* (Phillips et al., 2008).

Este estudio contribuye a mejorar el conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión genética en *Macrocystis*; la cual fue seleccionada como modelo biológico debido a su amplia distribución, puede completar su ciclo de vida reproductivo en condiciones de laboratorio y existe registros de su información genómica en el *GenBank* (238 secuencias de nucleótidos de ADN y ARN). Mientras el análisis de la expresión global de los genes en macroalgas pardas como *Ectocarpus siliculosus* ha sido investigada, conociéndose los cambios transcriptómicos frente a diferentes condiciones de estrés; en *M. pyrifera*, aún faltan por investigar. En este trabajo se realizó el estudio de transcriptómica global *de novo* en Perú utilizando secuenciamiento de RNA (RNA-seq) para examinar los cambios fisiológicos asociados a expresión diferencial de genes en respuesta a las diferentes condiciones de la marea.

Para el planteamiento de la hipótesis de la presente investigación doctoral, se consideró el hecho de que muchas macroalgas pardas habitan en zonas intermareales en ambientes de rápidas condiciones cambiantes debido al flujo de las mareas. Como organismos sésiles requieren altos niveles de tolerancia a varios estresores abióticos, tales como la presión osmótica, temperatura, nutrientes y luz (Küpper et al., 2008). La zona intermareal de las costas rocosas prevé a las macroalgas de un gradiente ambiental que se caracteriza por las diferencias significativas de diversos factores físicos (Davison y Pearson, 1996; Skene, 2004). Con estos antecedentes, la hipótesis planteada para la esta investigación, que permitió dilucidar el mapa transcriptómico de *M. pyrifera*, fue:

Los transcriptomas globales dilucidarían las respuestas adaptativas de *Macrocystis*, relacionadas a diferentes condiciones intermareal y submareal.

La presente tesis doctoral realizó la comparación del transcriptoma global *de novo* del kelp *M. pyrifera*, colectadas en la zona intermareal (0 m) y submareal (10 m), procedentes de praderas naturales en la localidad de Punta San Juanito, Ica, centro del Perú; utilizando herramientas moleculares como la tecnología de secuenciación RNA-seq para determinar si existe una respuesta diferencial en su transcriptoma, por efecto de las condiciones de las mareas.

1.1. Objetivo general

Realizar el estudio de genómica funcional, mediante la comparación del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera* en condición intermareal y submareal.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar el mapa transcriptómico *de novo* de *Macrocystis pyrifera* en condición intermareal y submareal, mediante RNAseq.
- Identificar probables genes candidatos de respuesta a la condición intermareal y submareal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. AGARDH 1820.

Las grandes algas pardas o *kelps* se caracterizan porque su cuerpo vegetativo se encuentra diferenciado y es similar a las plantas superiores, en su morfología se distinguen claramente un rizoides en forma de disco que alcanza hasta 40 cm de diámetro y 35 cm de altura que cumple la función de fijar el alga a un sustrato, posee aerocistos o neumatocistos que son vesículas llenas de aire permitiendo que la gran masa de alga flote en la columna de agua, uno o varios cauloides cilíndricos, flexibles, de ramificación dicotómica parecidos a tallos y filoides o frondas generalmente aplanadas que son lanceoladas, rugosas y asemejan a hojas con márgenes dentados; las frondas cercanas al disco basal no presentan aerocistos de flotación. Un organismo maduro puede tener 40 o más frondas en diferentes estados de crecimiento (juveniles, adultas y senescentes). *Macrocystis pyrifera* (Agardh, 1820) es de color café verdoso o amarillo parduzco y pueden llegar a medir desde 70 cm de largo y 30 cm de ancho; la planta completa sobrepasa hasta los 30 m. (Hauenstein y González, 1994) adhiriéndose fuertemente a los fondos rocosos, mediante sus rizoides o discos de fijación, formando extensas praderas una vez que las frondas alcanzan la superficie.

M. pyrifera es un buen colonizador, las frondas con sus neumatocistos o aerocistos les permiten mantenerse suspendidas en la columna de agua y las frondas fértiles pueden liberar las esporas mientras están a la deriva (Dayton, 1985; Schiel y Foster, 1986; Santelices, 1990). Adicionalmente, las esporas pueden permanecer viables en la columna de agua por varios días y latentes sobre los sustratos por algunos meses (Reed et al., 1992; 2006; Dieck, 1993; Ladah, 1999). La habilidad de colonización de *Macrocystis* es un importante aspecto para su dispersión geográfica; las algas adultas, con sus neumatocistos o aerocistos, son más propensas a tener una importante dispersión a grandes distancias (Macaya et al., 2005; Hernández-

Carmona et al., 2006). Macaya et al. (2005), determinaron que el 27 por ciento de las estructuras flotantes de *M. pyrifera* poseían frondas reproductivas funcionales, esporas viables en libertad, y se estimó que la fertilidad puede mantenerse durante un mínimo de 21 días.

2.1.1. La función de *Macrocystis pyrifera* en el ecosistema marino

Macrocystis pyrifera es una de las algas marinas más extensamente distribuidas en el mundo, forma densos bosques tanto en el hemisferio norte como en el sur, comparables a los bosques terrestres. Los neumatocistos en esporofitos adultos tienen también una estructura compleja y altos niveles de productividad primaria (Mann, 1973; Towle y Pearse, 1973; Jackson, 1977). La productividad primaria de *Macrocystis* puede alimentar la productividad secundaria a través de pastoreo directo de los consumidores en la cadena trófica, más carbón fijado probablemente se ingresa en la red alimentaria a través de la vía del detritus o es exportado del sistema (Gerard, 1976; Pearse y Hines, 1976; Castilla y Moreno, 1982; Castilla, 1985; Inglis, 1989; Harrold et al., 1998; Graham, 2004). En algunas regiones, *M. pyrifera* cumple la función de hábitat y suministro de energía para muchos invertebrados marinos, puede dar soporte a más de 275 especies (Beckley y Branch, 1992; Vásquez et al., 2001; Graham, 2004; Plana et al., 2007), evidenciando su rol ecológico en los ecosistemas donde habita.

La biomasa de *M. pyrifera* proporciona aplicaciones en diversas industrias a beneficio del ser humano, lo que les confiere su interés económico. El uso significativo de las algas cafés y en particular de *M. pyrifera*, parte del empleo del mucílago localizado en la pared celular y en los espacios intercelulares, el cual al ser tratado con carbonato de sodio y posteriormente con ácido mineral, produce el ácido algínico; este es un compuesto poliurónico muy estable a la hidrólisis, que por sí mismo es insoluble en el agua, pero tiene capacidad de absorberla y sus sales, excepto las sales de calcio, son solubles en agua. (Fujiki et al., 1994). Los alginatos se emplean en procesos en los que se requiere un agente espesante, gelificante, emulsificante, formador de películas a ciertas sustancias (Guzmán del Proo et al., 1981). Vásquez (1999) indica que los alginatos son ampliamente utilizados

en la industria de textiles aproximadamente en un 42 por ciento, alimentos con 34 por ciento, papel con 9.4 por ciento, farmacéutica y productos dentales con 5.3 por ciento y otras actividades productivas equivalente al 3.2 por ciento.

En nutrición de organismos acuáticos, *M. pyrifera* y *Ulva sp.* se han utilizado frescas y en alimentos extruidos para el erizo de mar *Loxechinus albus* en Chile, obteniendo buenos resultados en la formación de gónadas especialmente con el alimento extruido conteniendo en el *kelp* (Lawrence et al., 1997); en alimentos para el abulón, *Haliotis spp.* (Stuart y Brown, 1994; Marsden y Williams, 1996; González-Avilés y Shepherd, 1996; Viana et al., 1996; Fleming, 1998) y como attractante en la misma especie, aunque en forma fresca (Viana et al., 1994).

Por otro lado, se ha probado un efecto inmunoestimulante en alginatos de sodio de *Undaria pinnatifida* y *M. pyrifera* en contra de infecciones bacterianas (*Edwardsiella tarda*) en *Cyprinus carpio* L. (carpa común). Cruz-Suárez et al., 2000 evaluaron el efecto de la harina de *M. pyrifera* sobre algunas propiedades químicas y funcionales de alimentos para camarón blanco *Litopennaeus vannamei*; concluyendo en el aumento de la biomasa, crecimiento y consumo del alimento por parte del camarón blanco debido a las propiedades de la harina de *M. pyrifera*, la cual funcionó como un excelente aditivo, attractante, aglutinante y texturizante que permite la utilización más eficiente de los nutrientes dietarios al asegurar una menor lixiviación y amplia ingesta.

2.1.2. La transcriptómica y el estudio de la macroalgas marinas

La transcriptómica es un área de investigación que caracteriza el ARN transcrito a partir de un genoma en particular que se investiga. Aunque los transcriptomas son más dinámicos que la genómica del ADN, estas moléculas proporcionan acceso directo a la regulación de genes y la información de las proteínas (Trapnell et al., 2009). Entre las nuevas tecnologías de análisis genéticos como las técnicas de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing* NGS) tienen en común su capacidad para secuenciar de forma simultánea millones de fragmentos al azar del genoma o transcriptoma con la capacidad de lectura *in*

situ a medida que los nucleótidos se incorporan, varias son las principales aplicaciones de las NGS entre ellos la cuantificación del transcriptoma y caracterización de RNAseq (Glenn, 2011). Actualmente, las NGS de segunda generación son las más extendidas, incluyendo 4 plataformas: 454, Illumina, SOLiD e *Ion torrent*. La tecnología *Illumina* se basa en una PCR en puente. Las plataformas que producen lecturas largas, como 454 e *Illumina*, son óptimas para la caracterización del genoma y transcriptoma *de novo*, ya que estas secuencias son más adecuadas para el análisis computacional y ensamblaje mientras que los que producen lecturas más cortas se orientan a menudo para resecuenciación, perfiles de expresión y estudios poblacionales. La secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq) puede realizarse con una variedad de plataformas tecnológicas, como por ejemplo la plataforma de análisis del genoma mediante la tecnología de pirosecuenciación o 454 e *Illumina*.

La utilización de tecnologías para el estudio de la transcriptómica en macroalgas, abarca algunas investigaciones principalmente referidas a especies de los géneros *Laminaria*, *Ectocarpus* (Roeder et al., 2005; Ditammi et al., 2009; Martins et al., 2013) y único estudio en genómica funcional de *Macrocystis pyrifera* (Konotchick et al., 2012). Dittami et al. (2009) analizaron la expresión global del alga parda *Ectocarpus siliculosus* examinando los cambios transcriptómicos que ocurren durante la aclimatación térmica corta de esta alga a tres condiciones diferentes de estrés abiótico; demostrando que casi el 70 por ciento de la expresión de esos genes son regulados como respuesta a por lo menos uno de esos factores estresantes.

Por otra parte, Martins et al. (2013) realizaron un estudio sobre la expresión de genes sesgada por el sexo en la alga parda *Fucus vesiculosus* y estimaron que la expresión de los genes fue mayor para los machos con 14 por ciento de genes ortólogos frente a las hembras con nueve por ciento. Respecto a *M. pyrifera* se ha realizado un primer análisis transcriptómico de su función metabólica frente a variables como el gradiente de profundidad, luz, temperatura y nutrientes en diferentes estaciones del año creando cuatro librerías de ADNc y hallando alta similaridad con otros miembros de las *Phaeophyceae* como son *Ectocarpus siliculosus* y *Laminaria digitata* (Konotchick et al., 2012).

A continuación se detalla los estudios transcriptómicos realizados en algas pardas:

Tabla 1. Análisis trascríptomicos en *Phaeophyceae*

Tecnología	Estrés/variables ambientales	Especies	Referencia
Secuencias de Etiquetas Expresadas EST		<i>Laminaria digitata</i>	Roeder et al., 2005
Secuencias de Etiquetas Expresadas EST		<i>Sargassum binderi</i>	Wang et al., 2007
Secuencias de Etiquetas Expresadas EST	Estrés abiótico.	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Dittami et al., 2009
Secuencias de Etiquetas Expresadas EST	Estrés abiótico.	<i>Fucus serratus</i> , <i>F. vesiculosus</i>	Pearson et al., 2010
RNAseq.	Profundidad y estación anual	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Konotchick et al., 2012
Secuencias de Etiquetas Expresadas EST	Temperatura y Luz	<i>Saccharina latissima</i>	Heinrich et al., 2012
Secuencias de Etiquetas Expresadas EST	Térmico	<i>Fucus vesiculosus</i>	Martins et al., 2013
RNAseq. Illumina Hi seq TM2000	UV	<i>Saccharina japonica</i>	Wang et al., 2012 Deng et al., 2014
RNAseq. Illumina Hi seq TM2000	Luz azul UV-B	<i>Sargassum thunbergii</i>	Liu et al., 2014

El RNAseq utiliza tecnologías de secuenciación para la caracterización de transcriptomas, permite la cuantificación de los niveles de expresión de cada transcrito y su regulación bajo diferentes condiciones ambientales (Wang et al., 2009). Utilizando tecnología de RNAseq con secuenciamiento *Illumina* en plataforma *Hi Seq*TM 2000 se realizó el análisis de transcriptoma *de novo*, en veintidós especies de importancia comercial de Rodophytas (algas rojas) pertenecientes a los órdenes: Bangiales, Ceramiales, Gigartinales, Gracilariales, Halymeniales; mediante la anotación de genes, su función e identificación de vías metabólicas en las que participaban los unigenes anotados (Wu et al., 2014), otros estudios utilizando la misma tecnología de secuenciamiento del transcriptoma, incluyó especies de Rodophytas (algas rojas) intermareales como *Pyropia haitanensis* (Wang et al.,

2015) y en Phaeophytas (algas pardas) como *Sargassum thunbergii* (Liu et al., 2014), *Saccharina japónica* (Deng et al., 2012; Wang et al., 2012).

2.1.3. Zona intermareal

Las macroalgas son un componente dominante en los ecosistemas rocosos cercanos a las costas (Steneck et al., 2002), constituyen el hábitat y alimento de muchas comunidades de invertebrados (Edgar et al., 2004; Estes et al., 2004); por lo tanto cualquier alteración en la supervivencia, crecimiento y capacidad de competitividad de las macroalgas podría alterar el funcionamiento y composición de estos ecosistemas (Cornwall et al., 2012).

La distribución característica de los organismos a lo largo de un gradiente ambiental, ha sido un área importante de estudio durante más de un siglo. La zona intermareal de la costa rocosa representa un ejemplo clásico de zonificación, y tanto los hábitats aéreos y acuáticos suponen un reto para los organismos no móviles que viven allí, incluyendo las fluctuaciones cíclicas diarias de la temperatura, la radiación, la disponibilidad de nutrientes, salinidad y la desecación resultante de mareas; las diferencias fisiológicas entre las especies de macroalgas intermareales han sido reportados (Davison y Pearson, 1996).

La zona intermareal de las costas rocosas templadas prevé a las macroalgas de un gradiente ambiental que se caracteriza por las diferencias significativas de diversos factores físicos, en este contexto, numerosos estudios han demostrado que las diferencias entre las macroalgas del intermareal y las distintas mareas están relacionadas con la fisiología de la fotosíntesis; es decir, la tasa neta de fotosíntesis, resistencia a la fotoinhibición y recuperación fotosintética después de la desecación (Davison y Pearson, 1996; Skene, 2004). Por lo tanto, la caracterización de las variables que regulan el rendimiento fotosintético se ha considerado como un criterio decisivo para el cultivo (Ganzon-Fortes, 1997) y la optimización de las estrategias de gestión (Duarte y Ferreira, 1995).

2.2. Metabolismo en algas pardas.

El metabolismo de las algas se refiere a los procesos bioquímicos y de transporte mediante los cuales las algas toman los nutrientes y los transforman en materiales necesarios para el crecimiento, reproducción y defensa de los organismos; muchos de los procesos metabólicos que ocurren en las algas son comunes a los que se encuentran en otros organismos vivos (Beardall, 2012).

Las características morfológicas y metabólicas de las algas pardas varían (Cock et al., 2010); por ejemplo a nivel morfológico, en las algas los plastidios están rodeados por cuatro membranas, poseen una composición específica de la pared celular, vías metabólicas derivadas (Graisillier et al., 2014) y la capacidad de sintetizar oxilipinas tipo planta (C18) similares a oxilipinas de tipo animal (C20) (Ritter et al., 2008). Además, las algas marinas habitan en ambientes bastante hostiles y por lo tanto, están expuestas a muchos factores de estrés bióticos y abióticos tales como herbivoría, enfermedades, competencia, agotamiento de nutrientes y, en la zona intermareal, desecación, cambio rápido de salinidad, temperatura e irradiación. Las estrategias de defensa resultantes están contribuyendo a un significativo nivel de su diversidad estructural-química (Barros et al., 2005; Cardoso et al., 2007).

2.2.1. Almacenamiento de Carbono

La mayoría de las algas marrones se encuentran en la zona intermareal, un ambiente muy difícil donde se encuentran bajo restricciones marinas o terrestres de acuerdo con las mareas. Además de su interés como un linaje filogenético distinto y su papel ecológico en los ecosistemas marinos, las algas pardas también representan un recurso sostenible de valiosos compuestos para aplicaciones biotecnológicas (Wei et al., 2013), como los polisacáridos de pared celular, alginatos, fucanos sulfatados (Popper et al., 2011) y los compuestos de almacenamiento de carbono: Laminarina y manitol (Michel et al., 2010). Entre las algas pardas, se ha seleccionado *Ectocarpus siliculosus* como modelo biológico para estudiar procesos fisiológicos y ontogénicos (Charrier et al., 2008), y se ha

secuenciado su genoma (Cock et al., 2010). Esto ha permitido la identificación de las bases moleculares para varias rutas metabólicas peculiares en estos organismos (Groisillier et al., 2013).

El almacenamiento de carbono es un proceso fisiológico clave y las algas pardas acumulan carbohidratos al producir laminarina (un β -1,3-glucano vacuolar con ramificaciones ocasionales enlazadas con β -1,6) y manitol. Dependiendo de la especie de alga parda examinada, el manitol puede representar hasta 20-30 por ciento de su peso seco (Reed et al., 1985). Experimentos en *E. siliculosus* han sugerido que es probable que el manitol actúe como un osmoprotector o un osmolito local (Dittami et al., 2011). En la misma línea, este poliol constituye una porción significativa de los carbohidratos solubles en varias familias de plantas vasculares (incluidas las Apiaceae, Fabiaceae, Oleaceae, Poaceae y Rosaceae), donde representa uno de los principales productos fotosintéticos y es importante para aumentar la tolerancia al estrés salino y osmótico (Stoop et al., 1996; Conde et al., 2011).

El diferente comportamiento de la actividad del CO₂ se puede entender en términos de sus diferentes estrategias de vida de las algas que habitan en la zona intermareal para hacer frente a sus diferentes ambientes. Las macroalgas sometidas a los ciclos de las mareas, que sufren períodos de desecación diaria en el intermareal superior de la costa rocosa, no puede incorporar CO₂ durante su período de emersión debido al proceso de desecación que es coincidente con los niveles diarios más altos de irradiancia (dinámica de fotoinhibición) y tiene que aumentar drásticamente su actividad en anhídrido carbónico CA mientras se sumerge para compensar el período del día en que está en desecación (Groisillier et al., 2013).

2.2.2. Mecanismos de Concentración de Carbono MCC

Muchas especies de macroalgas viven en ambientes limitados por la luz y a medida que la luz aumenta, también se incrementa la tasa de fotosíntesis y el uso del bicarbonato HCO³⁻

(Cornelisen et al., 2007; Hepburn et al., 2011). El CO₂ puede ser utilizado directamente por las macroalgas, a través de la difusión, pero en la mayoría de los casos, la captación por difusión puede ser insuficiente para suplir las tasas máximas durante la fotosíntesis; para superar este problema, las macroalgas pueden utilizar el HCO₃⁻ o captar activamente el CO₂ a través de una gama de procesos denominados Mecanismos de Concentración de Carbono MCC (Raven, 1996). Se estima que en el MCC, la actividad energética descenderá lo que permite la utilización de esa energía para otras actividades fisiológicas como el crecimiento del alga (Zou y Gao, 2009). Esto podría cambiar la capacidad competitiva de las macroalgas, en ambientes con poca luz y elevado CO₂, dando lugar al cambio de la estructura de los ecosistemas de macroalgas cercanas a las costas (Cornwall et al., 2012).

El rendimiento fotosintético, determinado por la cuantificación del O₂ y la fluorescencia de la clorofila (Hanelt et al., 1992, 1993; Magnusson, 1997; Silva et al., 1998; Ensminger et al., 2000; Hader et al., 2001; Longstaff et al., 2002), ha descrito la aparición de un mecanismo fotoinhibitorio asociado con la depresión de la eficiencia fotosintética durante el mediodía, seguido por una recuperación durante la tarde (Ensminger et al., 2001; Gévaert et al., 2003), lo que sugiere que en algunos casos la fotoinhibición diaria es el resultado de la radiación ultravioleta UV

La radiación UV se ha descrito que tiene muchos efectos sobre la fisiología de las macroalgas. Las radiaciones UV alteran el ADN formando dímeros de timina (Karentz, 1994); la radiación ultravioleta B (UV-B) también altera la actividad fotosintética que causa la fotoinhibición (Figuerola et al., 2002). En términos de incorporación de nutrientes y asimilación, las radiaciones UV ha demostrado que ejercen una actividad inhibitoria (Dohler, 1996; Kumar et al., 1996) tras la incorporación de nitrógeno inorgánico, alterando las actividades enzimáticas responsables del Metabolismo del Nitrógeno (Sinha et al., 1995; Rai et al., 1998). La radiación UV también tiene efectos sobre contenido de pigmento (Figuerola et al., 2002), y es responsable de la inhibición en el crecimiento de las algas (Dring et al., 1996). Poco se sabe sobre los mecanismos celulares y moleculares de percepción de la radiación UV en algas o sobre el efecto de la luz ultravioleta sobre los procesos involucrados en la incorporación de carbono y asimilación de nitrógeno;

Underwood et al. (1999) mostraron que los mecanismos fotoprotectores contra la radiación UV podrían ser mejorados por la radiación visible.

2.3. Metabolismo Primario

En algas pardas el metabolismo primario ha sido investigado en diversas especies; siendo *E. siliculosus* el modelo biológico con mayor información reportada. Las algas pardas acumulan el carbón asimilado y en Laminariales, la laminarina se considera uno de los compuestos de almacenamiento (Michel et al., 2010). Los diversos procesos fisiológicos y genes implicados son descritos a continuación

2.3.1. Fotosíntesis (Ciclo Calvin-Benson)

La diversidad de algas incluye genotipos que pueden, a través de la evolución, crecer en grandes rangos de valores medios y extremos de flujo en la Radiación Fotosintéticamente Activa (siglas en inglés: PAR) en concentraciones altas y bajas de nutrientes disueltos y en amplios rangos de temperatura (Raven y Geider, 2003). También pueden influenciar los factores abióticos, como la salinidad, la mezcla de nutrientes en la columna de agua, y los factores bióticos, como herbívoros y parásitos/parasitoides, incluidos los virus (Falkowski y Raven, 2007).

La absorción de fotones en la fotosíntesis involucra pigmentos (cromóforos) unidos a apoproteínas específicas en complejos pigmentados recolectores de luz. Estas apoproteínas alteran las propiedades de absorción de los cromóforos en comparación con su estado libre y facilitan la muy alta eficiencia de la transferencia de energía de excitación de fotones absorbidos (excitones) a un complejo de pigmentos en el centro de reacción, donde se produce la transformación de energía de excitones en energía química. Los centros de reacción absorben fotones a longitudes de onda algo más largas que los complejos de pigmentos recolectores de luz; esto es necesario para la transferencia eficiente de energía del excitón desde la recolección de luz a los complejos del centro de reacción (Falkowski y Raven, 2007; Raven et al., 2013, 2014; Raven y Ralph, 2015).

En todos los organismos fotosintéticos oxigénicos los centros de reacción usan el pico de absorción rojo de clorofila a 680 nm en el fotosistema II (PSII) y 700 nm en el fotosistema I (PSI). El rango de pigmentos recolectores de luz, cubre todo el espectro visible. La variación en los coeficientes de absorción específicos de los pigmentos, indica la tasa de absorción de fotones; un costo importante de recursos para la absorción de fotones es la apoproteína asociada a cada molécula de pigmento. Las apoproteínas de los complejos de pigmento-proteína que recolectan la luz pueden ser las proteínas más expresadas en células fotosintéticas aclimatadas y/o adaptadas a bajos niveles de PAR, presentando así células con altos costos en el uso de energía, empleo nitrógeno y fósforo (a través del ARN) necesarios para su biosíntesis (Raven et al., 2013; Raven y Ralph 2015).

La mayoría de la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato NADPH y del Adenosin Trifosfato ATP, generados mediante la fotofosforilación no cíclica, se usan en la asimilación de CO₂ a través del ciclo de Calvin-Benson usando Ribulosa 1,5-bisfosfato Carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), como carboxilasa. La actividad oxigenasa de RuBisCO conduce a costos de energía adicionales. Todos los organismos fotosintéticos oxigenados, expresan una oxidación fotorespiratoria con Ciclos de carbono, que convierten dos 2-fosfoglicolato en un 3-fosfoglicerato (y por lo tanto Triosa fosfatos) con la pérdida de un dióxido de carbono y la entrada de ATP y NADPH para el metabolismo del glicolato; así como el ATP y NADPH utilizado en el ciclo de Calvin-Benson (Raven y Ralph 2015). La entrada difusa de dióxido de carbono del medio, a un RuBisCO, conduce a un costo mínimo de fotones de la fotosíntesis; dependiendo en la vía fotorespiratoria utilizada. Los Mecanismos de Concentración de Carbono MCC suprimen la fotorespiración, a un costo de energía. Todas las cianobacterias actuales y la mayoría de las algas tienen mecanismos de concentración de CO₂ que aumentan la concentración de dióxido de carbono en el sitio activo de RuBisCO y mejoran en gran medida la actividad carboxilasa y disminuyendo la actividad oxigenasa de RuBisCO; existiendo una gran variedad de mecanismos, que implican un costo de energético adicional (Losh et al., 2013; Raven, 2013).

La asimilación de nitrógeno puede ser energéticamente costosa, el costo adicional de energía es incurrido si el estado redox del elemento nutritivo difiere entre la forma

suministrada y la forma que se asimila durante el crecimiento. Por lo tanto, para la reducción del nitrato al amonio en la luz, la reducción de cada nitrato requiere NADPH. La respiración conduce a la liberación de CO₂; la conversión respiratoria de carbono orgánico al CO₂ es inevitable en el crecimiento y mantenimiento de las algas. Incluso en la luz, los procesos respiratorios son necesarios para producir esqueletos de carbono esenciales para su biosíntesis (Raven y Beardall, 2016).

2.3.1.1. *Ligth Harvesting Proteins*

La fotosíntesis es un proceso central en la fisiología de las plantas, el cual abarca la toma de la energía lumínica mediante dos tipos de complejos lumínicos: el fotosistema II (PSII) y el fotosistema I (PSI). El PSII es el más abundante de esos complejos ubicados en las membranas de los tilacoides y consta de pigmentos como clorofila y carotenoides los cuales están unidos a *chlorophyll binding proteins* (CBPs). Las *Ligth Harvesting Protein* (LHC) forman una familia con un gran número de proteínas, las cuales incluyen *chlorophyll a/b-binding proteins* (CABs), *fucoxanthin chlorophyll a/c-binding proteins* (FCPs) (Grossman et al., 1990; Caron et al., 2001), *high light-induced proteins* (HLIPs), *early light-induced proteins* (ELIPs), *psbS subunit of photosystem II* (psbS) y *stress enhanced proteins* (SEPs). Las *chlorophyll a/b-binding proteins* CABs, como también las *fucoxanthin chlorophyll a/ c-binding proteins* FCPs, juntas referidas como CBPs, se ha sugerido que han originado de las cianobacterias HLIPs como resultado de dos eventos de duplicación y la posterior pérdida de una transmembrana (Green, 1995), pero este escenario evolutivo ha sido recientemente cambiado por Engelken et al. (2010). Las *chlorophyll a/b-binding proteins* CABs y las *fucoxanthin chlorophyll a/ c-binding proteins* FCPs estaban frecuentemente reportadas para representar transcripcionalmente la respuesta al estrés lumínico (Tonkyn et al., 1992; Teramoto et al., 2002).

El efecto de la desecación en macroalgas está ganando auge, la comprensión de la respuesta al estrés por desecación en macroalgas ha sido evaluada en *Porphyra*, *Gracilaria*, *Chondrus*, *Ulva*, *Pyrophia*, *Fucus* y *Ectocarpus* (Smith et al., 1986; Abe et al., 2001; Ji y

Tanaka, 2002; Zou y Gao, 2002; Collén et al., 2007; Contreras-Porcía et al., 2011; López-Critoffanini et al., 2015; Fierro et al., 2017).

2.3.1.2. Proteínas chaperonas: *Heat Shock Protein* (HSPS)

En las células la función de las proteínas de estrés para la tolerancia térmica parece principalmente ser la prevención de la acumulación de proteínas dañadas por el calor. Se utilizan dos estrategias para hacer frente a este problema, en primer lugar, las proteínas de estrés, proteínas chaperonas, para prevenir el mal plegamiento y la agregación; en segundo lugar apuntar a proteínas dañadas por destrucción proteolítica (Hartl, 1996).

El papel de las proteínas de estrés, en conferir resistencia térmica a los organismos en ambientes extremos, es relevante para la comprensión de su ecología, fisiología y distribución. La evidencia experimental para su importancia se ha establecido en varias especies. La familia de proteínas de tensión-70 (proteínas de estrés de ~70-80 kDa de peso molecular) juega un papel central en la tolerancia térmica de muchos organismos. La inducción de la tolerancia térmica ha informado correlacionarse más estrechamente con la acumulación de Hsp70 que otras proteínas de estrés (Li y Werb, 1982). *In vitro*, la Hsp70 se ha demostrado que reactiva las proteínas dañadas (Schroder et al., 1993). La capacidad de Hsp70 para reactivar proteínas dañadas se piensa que es una extensión de su función normal (Rothman, 1989) en la estabilización total o parcial de proteínas desplegadas durante el montaje y desmontaje, la Hsp70 se sabe que interactúa con otras proteínas de estrés, para utilizar ATP (Hartl, 1996).

La isoforma de la proteína de 70 kDa se percibe con mayor intensidad en los cambios estacionales, en su concentración con la variación de temperatura y la termotolerancia, que los niveles de la proteína de 72 y 78 kDa. Se ha demostrado la isoforma 70 kD es la proteína más inducible por calor tras los aumentos de temperatura experimental. Como ya se ha señalado, se piensa que la Hsp70 está más fuertemente implicada en el desarrollo de la tolerancia a temperaturas extremas que otras proteínas de la misma familia (Smerdon et al., 1995).

Los distintos factores que ocasionan la lesión de una proteína también afectarán la abundancia de las proteínas de estrés durante los cambios estacionales. La función molecular de chaperona o proteínas de estrés, en el correcto plegamiento de polipéptidos nacientes, es tal que su expresión puede ser alterada por cambios fisiológicos no estresantes; como la biogénesis de proteínas necesarias para la formación de gametos y crecimiento. Las poblaciones naturales del mejillón, *Mytilus trossulus*, experimentan la máxima temperatura del cuerpo durante periodos de emersión intermareal (Hofmann y Somero, 1995). Tras la emersión de marea los mejillones son conocidos para entrar en un estado de depresión metabólica y la reducción de la demanda de energía celular. La evidencia indica que la síntesis de proteínas de estrés en *M. trossulus* se produce durante la recuperación de la emersión de la marea; además, se ha sugerido que la depresión metabólica experimentada durante la emersión restringe la energía disponible para la síntesis de proteínas de estrés hasta inmersión (Hofmann y Somero, 1995).

La función de muchas proteínas de estrés incluyendo Hsp70 requiere ATP (Lewis y Pelham, 1985) el mantenimiento de suficientes proteínas de estrés, para hacer frente a las proteínas dañadas se han asociado a costos energéticos que varían estacionalmente. La evidencia de los costes metabólicos de la expresión de la proteína de estrés a temperaturas normales ha sido registrado en *Drosophila melanogaster* (Feder et al, 1992; Sánchez et al, 1992; Krebs y Loeschcke, 1994). Por ejemplo, en el estudio en *Drosophila*, se ha demostrado que aunque el calor da lugar a la forma inducible de Hsp70, es beneficiosa para la supervivencia durante la exposición a altas temperaturas pero es perjudicial para el crecimiento y/o la división celular (Feder et al., 1992). Se ha planteado la hipótesis de que si la producción de proteínas de estrés es costosa para los organismos, y la selección natural ha trabajado en la optimización de la relación coste/beneficio de las proteínas de estrés, la variación en la producción de proteínas de estrés, se producirá en función de las condiciones ambientales (Coleman et al., 1995).

Hay pruebas de que el aumento de acumulación de proteínas de estrés no es el único factor implicado en el desarrollo de la tolerancia térmica a nivel celular. La síntesis diferencial de las isoenzimas, la utilización diferencial de las vías metabólicas, alteraciones en las tasas de recambio de las proteínas y los cambios en la composición de la membrana juegan un

papel en el cambio de la resistencia térmica de los organismos (Huey y Bennett, 1990). También se ha planteado la hipótesis de que el aumento de la tolerancia térmica puede implicar la fosforilación de HSPs preexistentes (Rouse et al., 1994). La evidencia experimental para esto viene de embriones de erizos de mar, en los que la fosforilación de HSPs constitutivos se correlaciona con termotolerancia inducidas (Roccheri et al., 1995). Otros factores conocidos por estar implicados en el desarrollo de la tolerancia al estrés puede incluir: La modificación post-traducciona l de las proteínas para promover el plegamiento apropiado y para reducir la susceptibilidad de las proteínas y subrayar daños. Se ha sugerido que la glicosilación en el retículo endoplásmico puede lograr esto (Kern et al., 1992). La aclimatación de temporada en los organismos es probable por la participación de otras adaptaciones fisiológicas y celulares, tales como cambios en la composición de la membrana. (Chapple et al., 1998).

2.4. Metabolismo Secundario.

2.4.1. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

La fotosíntesis es una fuente bien establecida de Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species* ROS) en las plantas. La cadena de Transporte Electrónico Fotosintético (siglas en inglés: PET) opera en un ambiente aeróbico; por lo tanto, se requieren sistemas de regulación para reducir al mínimo la producción de ROS. Por otra parte, una red antioxidante eficaz es también esencial con el fin de procesar eficazmente ROS y mantener grupos de ROS intracelulares en niveles bajos. La importancia de la red de antioxidantes en el mantenimiento de altas tasas de fotosíntesis se ha demostrado en muchos estudios, que han utilizado la genética molecular y se refieren a cualquiera de las enzimas antioxidantes desactivándolas o aumentando sus actividades o alterando la abundancia de antioxidantes de bajo peso molecular-MR como el Ascorbato (ASA) y *Glutati ón* reducido (GSH). Sin embargo, tales estudios a menudo han tenido en cuenta la producción fotosintética de reductores y oxidantes en el contexto de la homeostasis celular redox y la señalización redox (Foyer y Shigueru, 2011).

En general, se sugiere a menudo que la producción de ROS se debe minimizar a toda costa. Sin embargo, a pesar de su potencial para causar oxidaciones nocivas, ahora está bien establecido que las ROS son también potentes moléculas de señalización que están implicados en el control del crecimiento y desarrollo de la planta, así como de respuestas de aclimatación frente a estímulos (Jones, 2006; Foyer y Noctor, 2009). El aumento de la producción de ROS que conduce a la oxidación mejorada en luz alta puede ser considerado como una señal de gran alcance que no sólo disminuye la actividad de PSII sino que también estimula la expresión génica, en particular con respecto a los genes de aclimatación y de defensa (Foyer y Shigueru, 2011).

2.4.2. Haloperoxidasas: *Vanadium Dependent Bromoperoxidase*

Las paredes celulares de algas marinas pardas contienen microfibrillas principalmente de celulosa, varias proteínas, y dos polisacáridos: Alginatos (ALG) y Fucanos sulfatados (Kloareg y Quatrano, 1988). El alginato es un polisacárido lineal formado por unidades de ácido de ácido α -1,4-L-gulurónico y β -1,4-D-manurónico; el polímero contiene bloques de secuencias poligulurónicas y/o polimanurónico (Kloareg y Quatrano, 1988). Este polisacárido juega un papel esencial en la pared celular de las algas marinas, que actúa como una barrera iónica y marco estructural (Kloareg y Quatrano, 1988; Andrade et al., 2004; Salgado et al., 2005). Adicionalmente, sustancias fenólicas (siglas en inglés: PS), metabolitos secundarios producidos por las algas marrones o pardas, fueron descritos como componentes de los complejos ALG en la pared celular de algas. Las sustancias fenólicas juega un rol importante en muchos procesos fisiológicos, como la protección de las células de algas contra la radiación ultravioleta (UV), la inhibición de la herbivoría, el bloqueo de polispermia, a la unión de metales pesados y la adhesión de esporas (Kloareg y Quatrano, 1988).

El mecanismo de unión entre el ALG de pared celular y PS es mediada por la enzima Vanadio Bromoperoxidasa Dependiente (VBPO) (Vreeland et al., 1998; Schoenwaelder, 2002; Arnold y Targett, 2003). Esta enzima se determinó que está presente en muchas especies de algas pardas y rojas (Shimonishi et al., 1998; Vreeland et al., 1998; Weyand et

al., 1999; Berglin et al., 2004; Colin et al., 2004). En las algas marrones o pardas, el VBPO puede actuar sobre la oligomerización de PS (Berglin et al., 2004) y también en la formación de adhesivos naturales en las algas (Bitton et al. 2006). En relación con estos adhesivos naturales, se demostró que el PS oxidado por VBPO al someterse a auto-montaje, forma con la ALG un tipo de grupo macromolecular en el que el PS se encapsulan por la red del gel de ALG (Bitton et al., 2006).

Los tres tipos de Haloperoxidasas (Bromoperoxidasas, Iodoperoxidasas y Chloroperoxidasas) se describieron en varias algas rojas y pardas o marrones, como Corallina, Laminaria, Fucus, y Dictyota (Shimonishi et al., 1998; Vreeland et al., 1998; Weyand et al., 1999; Colin et al., 2004). A pesar de la diversidad entre las divisiones de algas, la evolución y la similitud de los Haloperoxidasas Vanadio Dependiente se demostró por análisis filogenético (Colin et al., 2004). Debido a las aplicaciones biotecnológicas de los alginatos, la influencia de PS en las propiedades reológicas de ALG ha sido ampliamente estudiada. Algunos autores han demostrado que la PS puede inhibir el desarrollo microbiano, lo que inhibe la secreción de alginato liasa por bacterias e, indirectamente, la degradación ALG (Moen et al., 1997). En consecuencia, se sugirió que la PS conserva la propiedad viscosa de ALG (Moen et al., 1997).

Por el contrario, otros autores sugirieron que el PS que se encuentra en fracciones en el ALG es un contaminante que induce, en algunos casos, la reducción de su viscosidad (Moen et al., 1997; Davis et al., 2004; Tam et al., 2006). Sin embargo, se demostró que la simple adición de PS a una solución ALG no causó una reducción significativa en la viscosidad del alginato, incluso cuando se utilizó una concentración PS 10 veces mayor que la concentración de alginato. Otro estudio presentado con un resultado similar, reveló que la adición de polímeros fenólicos oxidados (oxidación mediada por una enzima VBPO) a una solución ALG no modificó su viscosidad (Bitton et al., 2006). Proponemos que la reducción de la viscosidad ALG es causada por la unión entre PS y ALG mediada por VBPO. El PS aislado de *P. gymnospora* poseen una larga cadena de ácidos grasos, una característica estructural que aumenta significativamente su propiedad hidrófoba. Esta

cadena de ácido graso puede interferir en la interacción entre las moléculas de ácido urónico y, en consecuencia, inhibir el proceso de gelificación del alginato que normalmente se produce en presencia de cationes divalentes (Colin et al., 2004).

2.5. Defensas químicas de algas pardas.

Las algas en sus respuestas al estrés biótico y abiótico para proporcionar protección contra la infección y la toxicidad, están bajo el control de una gran cantidad de moléculas reguladoras; los Ácidos Grasos Poliinsaturado (AGPI) y sus derivados oxidados juegan un papel clave en la señalización implicada, a las respuestas al estrés, tanto en vegetales como en animales (Farmer, 1994; Farmer et al., 1998). Similar a mamíferos, durante el estrés biótico y abiótico, como la infección y exposición a xenobióticos en plantas, inducen a cascadas oxidativas de los Ácidos Grasos Libres (AGL) que conducen a la síntesis de hormonas del estrés (Blechert et al., 1995; Howe y Schilmiller, 2002). Muchos de los genes de defensa en las plantas están regulados por las vías de señalización, que implican una molécula de peso molecular más bajo, tal como el Ácido Jasmónico (JA), el Ácido Salicílico, el Etileno y, posiblemente, Peróxido de hidrógeno H_2O_2 (Collen y Pedersen, 1994).

Las plantas sintetizan compuestos de toxicidad antimicrobiana directa; las Especies Reactivas de Oxígeno (siglas en inglés ROS), fitoalexinas, relacionadas con la patogénesis y activan los genes que participan en la cascada de oxilipinas, tales como las lipoxigenasas, en un proceso similar a la cascada del Ácido Araquidónico que participa en la activación de la respuesta inmune en los mamíferos. Por lo tanto en las plantas, el ataque de patógenos desencadena tanto la producción de ROS y la cascada de la oxidación de Ácidos Grasos Libres AGL, lo que lleva a la producción de Oxilipinas bioactivas. En los sistemas de algas, un estallido oxidativo se descubrió inicialmente en respuesta a una lesión en un alga roja (Collen y Pedersen, 1994). En estudios con modelos de algas rojas y pardas, se observó estallidos oxidativos en respuesta a oligosacáridos elicitors, en la mayoría de los casos para controlar el crecimiento de biopelículas bacterianas (Küpper et al., 2001; 2002) o el ataque de hongos endófitos eucariotas (Küpper et al., 2002). La participación de un

estallido oxidativo en la cicatrización de una herida como respuesta de un alga verde, *Siphonalean*, se puso de relieve, incluyendo su adhesión a la comunicación con la señalización del óxido nítrico (Ross et al., 2005; 2006).

Las poblaciones de algas pardas (*Phaeophyceae*) se ven afectadas por diversos patógenos, incluyendo hongos y oomicetos (Küpper y Müller, 1999; Gachon et al., 2006; Sekimoto et al., 2008), virus (Müller et al., 1998), bacterias (Sawabe et al., 1998; Sawabe, 2000) y endófitos patógenos (Ellertsdóttir y Peters, 1997).

Las defensas químicas de algas pardas incluyen metabolitos secundarios tales como Terpenoides y Polifenoles (Hay y Fenical, 1988; Steinberg, 1992; Cronin y Hay, 1996; Hay, 1996; Pavia y Toth, 2000), así como compuestos derivados de ácido grasos, tales como hidrocarburos C11 (Hay et al., 1998; Schnitzler et al., 2001). Estos últimos son parientes estructurales de las feromonas sexuales de las algas pardas (Müller et al., 1971; Maier, 1995). Al igual que aquellos, su biosíntesis se origina a partir de ácidos grasos C20 poliinsaturados escindidos (Moore, 1999). Este último también parece aplicarse para aldehídos C10 que desempeñan un papel clave en la defensa química de diatomeas, un linaje *heterokontophyta* estrechamente relacionado con las algas pardas (Miralto et al., 1999). Aparte de éstos, otros estudios relativos a oxilipinas de algas marrones, a pesar de que revela una gran cantidad de información, eran descriptivos en términos de estructura y función, con sólo unos pocos aspectos funcionales tomados en cuenta (Gerwick, 1994).

No está claro si los compuestos tales como el ácido jasmónico JA y derivados tienen un papel en el mar, ya que lo tienen en los ecosistemas terrestres (Toth y Pavía, 2000), o si otros compuestos cumplen un papel comparable. Del mismo modo, existe poca información sobre el papel de las moléculas de derivados de lípidos en la señalización intracelular, relacionada con la defensa de las algas pardas (Küpper et al., 2009).

Esporofitos de Laminariales, un orden de algas marrones grandes (*Kelp*) y morfológicamente muy complejos que forman los bosques de algas y muchos de los cuales son de valor comercial (McHugh, 2003), reconocen fragmentos de su principal polisacárido de la pared celular, el alginato, y reaccionan con una rápida ráfaga oxidativa

(Küpper et al., 2001). La transducción de señales tras el reconocimiento del elicitor implica la fosfolipasa A2 (Küpper et al., 2001), los dos ácidos grasos libres y las oxilipinas juegan un papel en la activación de las respuestas de defensa (Küpper et al., 2006), similar a las plantas superiores (Chandra et al., 1996). El estallido oxidativo juega un papel crucial para controlar el crecimiento de bacterias epifitas, potencialmente patógenas (Küpper et al., 2001; 2002), la producción de H₂O₂ en concentraciones suficientes para reducir el crecimiento bacteriano de manera significativa y para reducir el número de microorganismos en las superficies de algas. Además, la explosión oxidativa es seguida por una emisión mejorada de halocarbonos yodados, de mayor toxicidad microbiana que los compuestos clorados o bromados que se liberan en condiciones de estado estacionario no acentuadas (Palmer et al., 2005) y por un fuerte flujo de salida de yoduro acumulado (Küpper et al., 2008).

Se demostró que tanto la liberación de ácidos grasos de las membranas y su oxidación, acompañan a la explosión oxidativa desencadenada por los lipopolisacáridos en *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux (Küpper et al., 2006). En las plantas terrestres, los resultados en *Arabidopsis* apunta al ácido linolénico (C18:3) como un activador eficaz de NADPH oxidasa, mientras que el ácido linoleico (C18:2), ácido araquidónico (C20:4) y el Jasmonato de Metilo (MeJA) muestran un efecto más débil (Yaeno et al., 2004). También se demostró que una aplicación exógena de MeJA induce la acumulación de H₂O₂ resultante de la actividad NADPH oxidasa en tomate (Orozco-Cárdenas y Ryan, 2001). Un enlace de reconocimiento entre C20:4, la resistencia sistémica adquirida y la inducción de una explosión oxidativa en la patata ha sido reportada (Yoshioka et al., 2001).

Existe evidencia sobre la implicación de los ácidos grasos y sus derivados oxidados en las interacciones planta-patógeno (Farmer, 1994; Farmer et al., 1998); Küpper et al. (2006) demostraron que las algas pardas y rojas no son una excepción. Adicionalmente, los PUFA libres C20: 4 y C18: 3 son fuertes activadores de una explosión oxidativa en *Laminaria*, y la NADPH oxidasa es al menos parcialmente responsable de la producción de ROS (Küpper et al., 2009).

Küpper et al. (2009) demostraron que las algas de color marrón con talos complejos, tales como *L. digitata* y *M. pyrifera*, pueden utilizar ácido linolénico y ácido araquidónico libres

como potentes activadores de reacciones de defensa. Estos ácidos grasos son susceptibles de ser lanzados en vivo, durante el ataque de patógenos, ya sea directamente por la acción del patógeno en la membrana celular o por la activación de la fosfolipasa (Chandra et al., 1996), en la cadena de transducción de señales tras el reconocimiento inductor. El producto químico o la oxidación enzimática y la ciclación de estos ácidos grasos a ciclo pentenonas, especialmente en el contexto de una explosión oxidativa (Küpper et al., 2001), podría producir tanto Jasmonato (derivado del C18) y Prostaglandina (derivado del C20). Por ejemplo, la fase haploide resistente de *C. crispus* produce compuestos tanto biológicamente activos como las oxilipinas C20 y C18 cuando es desafiado por los extractos de patógenos (Bouarab et al., 2004). Sin embargo, estas oxilipinas no desencadenan una explosión oxidativa en *C. crispus* (Bouarab et al., 2004). Kupper et al. (2009) infirieron que tanto ácido linoleico C18 y el ácido arquidónico C20, derivados de las PUFAs, pueden ser reconocidos como señales de defensa o convertidos en tales señales en Laminariales.

El Metil jamonato (MeJA), es un regulador de los genes relacionados con la defensa, y es ahora bien conocido por ser un mensajero volátil entre los individuos de las plantas terrestres (Mur et al., 1997); el papel de señalización de MeJA (o ciclopentenonas estructuralmente similares) en Laminariales está respaldada por los datos de transcriptómica del alga roja *C. crispus*, lo que sugiere que MeJA es un regulador de los genes relacionados con la defensa, incluyendo la NADPH oxidasa (Collén et al., 2007), y que desencadena una cascada de oxidación PUFA que conduce a la biosíntesis de prostaglandinas y otras oxilipinas (Gaquerel et al., 2007).

El óxido nítrico juega un rol de señalización frente al estrés oxidativo, las algas pardas producen el ácido linoleico C18 y el ácido arquidónico C20, como respuesta al estrés oxidativo mientras que son desactivados o no producidos los ácidos oleicos (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2) frente a la producción de ROS se activan genes para la producción de ácidos grasos como las oxilipinas por medio de lipooxigenasas (Küpper et al., 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio.

El sitio de muestreo se realizó en la zona centro del Perú, en Punta San Juanito, ubicado en el Distrito de Marcona perteneciente a la Provincia de Nazca, Departamento de Ica, perteneciente a la Región Ica. Limita por el norte con el Distrito de Nazca, por el sur con la Provincia de Caravelí (Arequipa), por el este con la Provincia de Lucanas (Ayacucho) y por el oeste con el Océano Pacífico. Esta zona está influenciada por el Sistema de Corrientes Peruanas o Sistema de la Corriente de Humboldt (SCH), de aguas frías provenientes del sur, que abarca desde los 4° latitud sur, hasta Chile; siendo Marcona uno de los principales lugares de surgencias en el mundo (IMARPE, 2010). ANEXO.1

3.1.1. Muestreo

El muestreo se efectuó en una localidad ubicada en Punta San Juanito a S 15° 15' 11.3", W 0.75° 13' 32.4" designada como "Estación de colecta". Para los muestreos se realizó buceo autónomo y se colectó 8 individuos enteros en 2 condiciones: A 0 m de superficie y 10 m de profundidad, 4 individuos para cada condición. De cada macroalga se colectó tres piezas pequeñas de tejidos de las zonas apicales (Macaya, 2005) procedentes de tres fronda distintas a lo largo del mismo estipe. Todas las muestras de tejido se colectaron en la misma zona apical para lograr consistencia en el muestreo y minimizar la variabilidad en la toma de las muestras.

Una vez colectadas las muestras de tejido, y sus respectivas réplicas para ambas condiciones de muestreo, se limpiaron de cualquier epifita visible mediante un lavado

con etanol al 96 por ciento usando gasa estéril. Se pesó un gramo de tejido de las frondas, se colocaron en un tubo *corning* esterilizado de un volumen de 15 ml y se adicionó 10 ml de *RNA Stabilizing Solution (RNA Later)*.

3.1.2. Condiciones experimentales

Para la preparación de la librería transcriptómica, identificar probables genes candidatos involucrados en el metabolismo primario y secundario de *Macrocystis pyrifera*; así como para conocer los genes implicados en la síntesis de alginatos y otros polisacáridos de importancia industrial como posibles respuesta al estrés frente a condiciones intermareal y submareal; en la estación de colecta se muestreó:

- A 0 m (Intermareal)

Con la finalidad de identificar los probables genes de respuesta que se expresan en condiciones intermareales y determinar una expresión génica diferencial. Para esta condición se designó como código de muestra T2A.

- A 10 m de profundidad (Submareal)

Como situación control se consideró una colecta a 10 m de profundidad, debido a que en estas condiciones las macroalgas mantienen un estado normal de desarrollo. Para esta condición se designó como código de muestra T2B.

3.1.3. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras colectadas se realizó de la siguiente manera:

Los tejidos algales conservados en 10 ml de *RNA Stabilizing Solution (RNA later)*, almacenados en tubos *corning*, fueron transportados en hielo seco. Los tejidos algales almacenados en bolsas *ziploc* cerradas, fueron sumergidos en nitrógeno líquido contenido en un tanque especial para su transporte; ambas condiciones de almacenamiento fueron

llevados al laboratorio de Micología y Biotecnología LMB de la Universidad Nacional Agraria La Molina UNALM en Lima, para los análisis respectivos.

3.2. Transcriptómica

Los análisis genéticos para realizar el Mapa global del transcriptoma *de novo* de *M. pyrifera* fueron realizados para ambos tratamientos, a 0 m (T2A) y 10 m (T2B).

3.2.1. Extracción de ARN

Las muestras trasladadas al laboratorio, en *RNA Stabilizing Solution (RNA later)*, fueron almacenadas a -20°C y las muestras trasladadas en nitrógeno líquido fueron almacenadas a -80°C, ambas para los análisis de extracción de ARN.

Para la extracción de ARN, se realizó dos protocolos de extracción:

3.2.2. Para realizar los análisis de *qPCR*:

- Para la extracción del ARN se usó el *RNAeasy mini kit* (Quiagen):
- 1 g de tejido algal se pulverizó usando nitrógeno líquido y se utilizó 20 mg de la biomasa obtenida.
- Se agregó 1000 µl de *Qiazol* (Qiagen)
- Luego se centrifugó por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C
- Se retiró el sobrenadante y colocó en un nuevo tubo
- Se agregó 500 µl de cloroformo, se dejó actuar a temperatura ambiente por cinco minutos.
- Se centrifugó por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C
- Se colectó el sobrenadante y se agregó 500 µl de isopropanol, se dejó actuar a tres minutos a temperatura ambiente

- Se centrifugó por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C
- Se eliminó el sobrenadante y se observó el *pelet*
- Se agregó 1000 µl de etanol al 75 por ciento de pureza
- Se centrifugó durante cinco minutos a 8.000 rpm a 4°C
- Se dejó secar los microtubos al ambiente
- Y se re suspendió el *pelet* en agua *DEPC* a 50 µl

Una vez extraído el ARN se midió la pureza de sus concentraciones mediante el espectrofotómetro *Nanodrop* (ND1000) a partir de muestras de dos µl. Se determinó el grado de pureza del ARN obtenido por las relaciones de las absorbancias de 260/230 y 260/280nm y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al uno por ciento *buffer MOPS*.

4.1.1. Para los análisis de RNA seq

Para la extracción de ARN a utilizado en los análisis de RNA *seq*, se usó el mini kit de extracción de *Qiagen Rneasy*, cuyo protocolo está anteriormente escrito, con el tratamiento *dnase*. Una alícuota de la muestra se corrió en el *Bioanalyzer RNA (AGILENT)* para analizar la integridad del ARN extraído.

3.2.3. Purificación de ARN

La purificación del ARN se realizó para los análisis de la PCR en tiempo real y para los análisis de RNA *seq*:

4.1.1.1. Purificación de ARN para los análisis de qPCR

El ARN extraído se purificó con la columna *Zymo-Spin IIC* del kit *Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH)*, los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Se añadió en un microtubo de 1.5 ul, un volumen de etanol al 95 por ciento igual al de la muestra de ARN a purificar.
- Se mezcló por *vórtex*
- Se agregó la mezcla anterior a una mini columna *Zymo-Spin IIC* y se centrifugó por un minuto
- Se colocó la columna a un nuevo tubo y se descartó el tubo anterior con el centrifugado
- Se agregó a la columna 400 ul de *Direct-zol RNA Pre-wash* y se centrifugó por un minuto
- Se descartó el centrifugado y se repitió el paso anterior.
- Se agregó a la columna 700 ul de *RNA Wash Buffer* y se centrifugó por un minuto. Se descartó el centrifugado
- Nuevamente se centrifugó por dos minutos
- Se añadió a la columna 50 ul de *DNase/RNase- Free Water* y se centrifugó por un minuto.
- El ARN eluido y purificado se almacenó a -80°C.
-

4.1.1.2. Purificación de ARN para los análisis de *RNA seq*:

De un µg de ARN de óptima calidad, el ARNm se purificó usando perlas de *oligodT* (*TruSeq RNA Sample Preparation Kit, Illumina*).

3.2.4. Síntesis de ADNc por Transcripción reversa

La síntesis de ADNc por Transcripción reversa, se realizó:

4.1.1.3. Síntesis de ADNc por Transcripción reversa para los análisis de qPCR

Para la síntesis de la primera cadena del ADNc, como primer paso se utilizó dos µg de ARN y se agregó 0.5 µg del primer por microgramo de la muestra de mRNA en un volumen total menor a 15 ul con agua ultrapura; el microtubo con la mezcla se incubó a 70°C durante cinco minutos y posteriormente se lo colocó en hielo.

Como segundo paso para la síntesis de la segunda cadena de ADNc por Transcripción reversa, a la mezcla anterior, se agregó cinco ul del buffer *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV-RT) (PROMEGA) 5x, más 1.25 ul de cada uno de los dNTP's (A, C, G, T), 25 unidades de *RNase inhibitor* y se completó con agua ultrapura el volumen final a 25 ul. el microtubo con la mezcla se incubó a 42°C por una hora.

4.1.1.4. Síntesis de ADNc por transcripción reversa para los análisis de RNA seq

Para el diseño de la librería empleando *TruSeq RNA Sample preparation Kit* (Illumina), se siguió el siguiente protocolo:

Un µg del total de RNA se sometió a purificación de *Poly A* del mRNA. El mRNA fue fragmentado por acción de elevada temperatura (94°C) durante dos minutos, en presencia de cationes divalentes, se produjo la transcripción inversa por acción de la *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies) mediante cebadores de hexámeros al azar.

La segunda cadena de ADNc se sintetizó en presencia de ADN Polimerasa I y RnaseH, el DNAc se limpió usando *HighPrep PCR* (MAGBIO). Adaptadores *Illumina* se ligaron a las moléculas de cADN reparadas al final, luego de agregar las bases A. *SPRI cleanup* se diseñaron después de la ligación. La librería se amplificó usando ocho ciclos de PCR para enriquecimiento de adaptadores ligados a fragmentos. La preparación de la librería se cuantificó usando *Qubit* y la calidad validada mediante la corrida de una alícuota *High Sensitivity Bioanalyzer Chip* (Agilent). Fig. 1

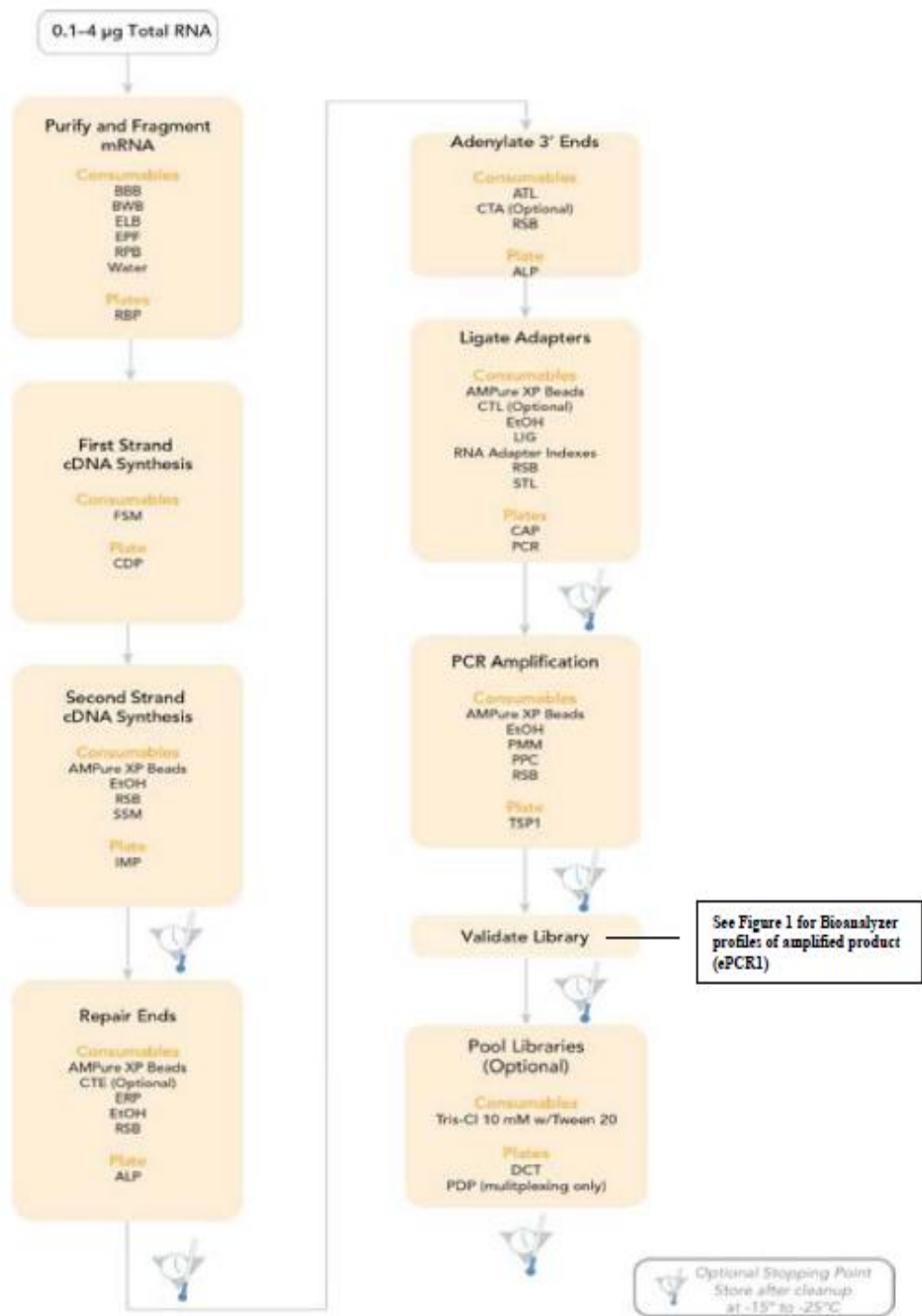


Figura 1. Diagrama de flujo para la preparación de las librerías de las muestras de ARN de *Macrocystis pyrifera* para el análisis de RNAseq. Fuente: Laboratorios *Genotypic* (India).

3.2.5. RNAseq ensamblaje del Transcriptoma *de novo*

Usando la plataforma de análisis *NextSeq 500 (Illumina)* en los laboratorios *Genotypic (India)* realizó el ensamblaje del transcriptoma *de Novo* para las muestras de *Macrocystis pyrifera* en condiciones de 0 m y 10 m. Para el control de la calidad de las secuencias, se utilizó el software *FastQC*, las lecturas de la secuenciación fueron procesadas con *Trinityrnaseq*. La anotación para todos los transcritos únicos (>150bp) se realizó usando *BLAST*, la homología se comparó con la base de datos *NCBI-NR Protein* y *Uniprot*. Los homólogos *KEGG* se identificaron usando el servicio de anotación automática *KEGG (KAAS)* con parámetros por defecto. Los resultados *hits* del *NCBI BLAST* se procesaron con el software *BLAST2GO* para recuperar términos asociados *GO* que describieron procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares utilizando como referencia las secuencias proteicas de *Ectocarpus siliculosus* (Dittami et al., 2009). Los niveles de expresión de todos los transcritos en la librería individual se evaluaron por un mapeo de lecturas de alta calidad (HQ) usando *BOWTIE2* (Langmead & Salzberg, 2012).
Fig.2

Basado en los resultados de la cuantificación transcriptómica, la herramienta *GO Elite* (Zambon *et al.*, 2012) se usó para identificar significancia estadísticamente regulada en categorías *GO* y vías *KEGG* con un nivel <0.05 para los transcritos regulados. Los transcritos con homología estadísticamente significativa para los genes términos *GO* y vías *KEGG* identificados con la herramienta *GO Elite* se utilizaron como una entrada para el análisis de significancia biológica y modelado de análisis biológico con red (*BAN*).

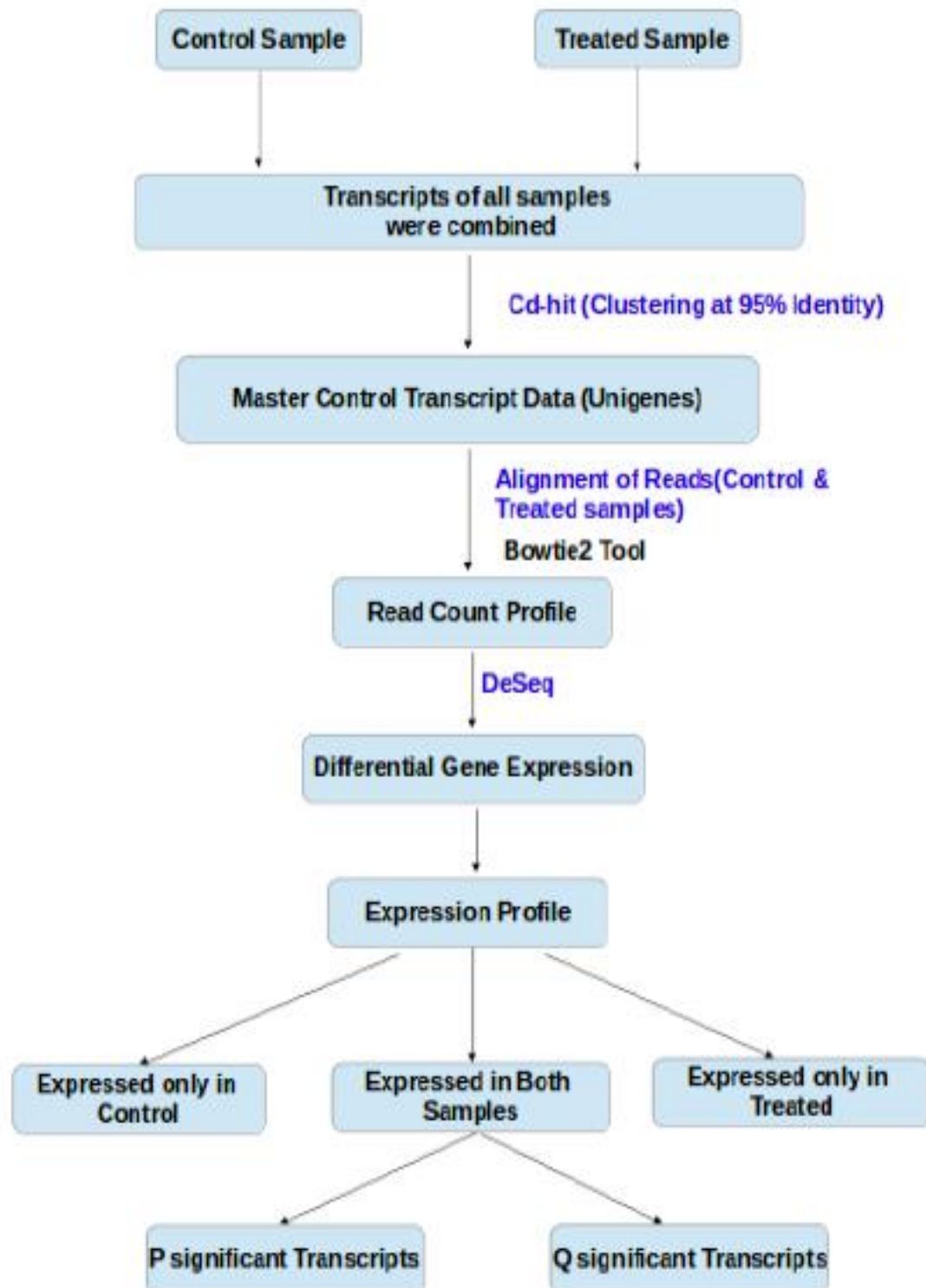


Figura 2. RNAseq ensamblaje del Transcriptoma *de novo* de *Macrocyctis pyrifera*: Procesos empleados para el análisis DESeq para los tratamientos 0 m (T2A) y 10 m (T2B). Fuente: Laboratorios *Genotypic*. (India).

3.2.6. Diseño de *Primers* RT-PCR en Tiempo Real

Para el diseño de los *Primers* RT-PCR y determinar los genes implicados en el transcriptoma global de *M. pyrifera*, se tomó como punto de partida los transcritos que participan en el metabolismo primario y secundario de *M. pyrifera*; así como la ruta biosintética de alginatos en algas pardas (Draget et al., 2005; Nyvall et al., 2003) se identificó los genes Alg C, Alg D y Alg G de *Ectocarpus siliculosus*, relacionados a esta vía (Michel et al., 2010; Prigent et al., 2014). La búsqueda de los genes se realizó utilizando las bases de datos *UNIPROT* y del Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés: *NCBI*, sitio *web*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

En el diseño de los *primers* se consideró el rango en la longitud del producto de 20 a 24 pb siendo el tamaño óptimo de 21 pb, el porcentaje de GC entre el 50 al 70 por ciento y el óptimo el 60 por ciento. La Temperatura de Fusión (T_m) fue de 5°C mayor a la temperatura de *annealing*. Una vez seleccionados los primers, se encargó su síntesis química a los laboratorios de *MACROGEN* en Corea del Sur; los primers sintetizados, se reconstituyeron a una concentración de 10 μ M con agua ultrapura. Se almacenaron los primers a 4°C durante 24 horas, una vez re constituidos se almacenaron a - 20°C hasta su utilización. ANEXO 4.

3.3. Análisis Bioinformáticos

Para los análisis bioinformáticos en el diseño de *primers* se usó programas libres:

3.3.1. Software para el diseño de los *primers* para PCR en Tiempo Real:

- Se analizó secuencias mediante *Bioedit* (Hall, 1999)
- Para el diseño se usó *PRIMER3 PLUS* (Untergasser et al., 2012)

- *Tm Calculator* v1.7.2 (*BioLabs*) se utilizó para determinar la Temperatura de Fusión (Tm).
- Una vez creados los *primers*, se seleccionó aquellos que no presentaban dímeros, utilizando el software *FastPCR* v 6.5. (Kalendar et al., 2011; 2014) y se realizó un análisis de PCR *In silico*.
- Adicionalmente, para evitar la formación de dímeros, se probó la especificidad del *primer* diseñado realizando un *PRIMER BLAST*.

3.3.2. Software para los análisis de RNA seq:

- Para determinar la calidad de las lecturas se utilizó el *software FastQc*
- Para el ensamblaje del Transcriptoma *de novo* el *software Trinity* (Grabherr et al., 2011)
- Para la anotación transcriptómica e identificar homologías se usó *NCBI-BLAST* v.2.2.31 (Altschul et al., 1990)
- El servidor utilizado para la identificación de las vías metabólicas fue *KAAS* (Moriya et al., 2007)
- El programa usado para identificar proteínas grandes y secuencias de nucleótidos fue *CD-HIT* (Weizhong y Godzik, 2006)
- Para el análisis de la expresión diferencial de genes se utilizó el *software DeSeq tool* (Anders y Wolfgang, 2010).

Se presenta un diagrama de flujo para ilustrar los diferentes programas empleados para el análisis del transcriptoma global de *M. pyrifera* en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2 B). Fig. 3

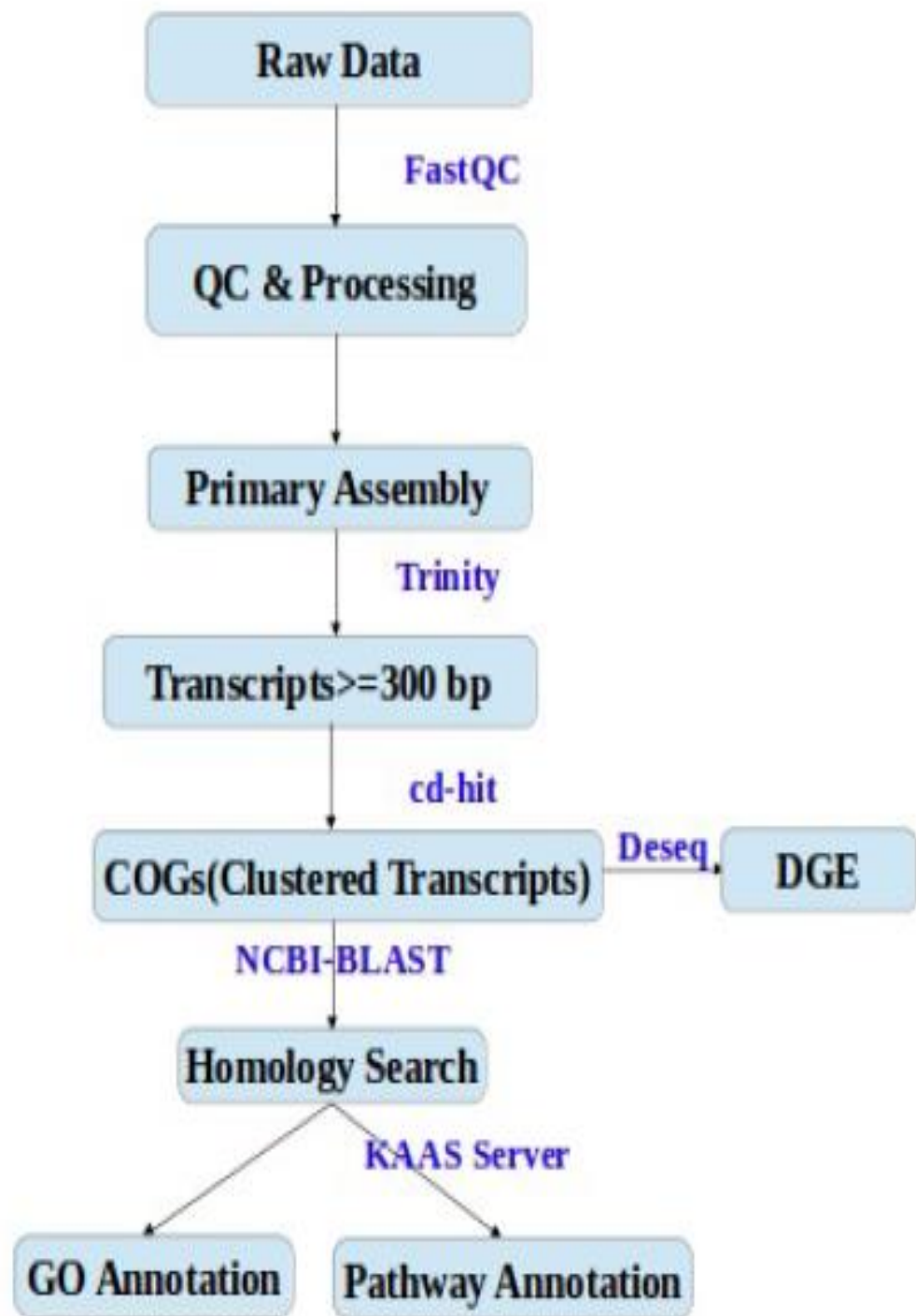


Figura 3. Diagrama de flujo que ilustra los diferentes software empleados para el análisis transcriptómico global de *Macrocyctis pyrifera* en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2 B). Fuente: Laboratorios *Genotypic*. (India).

3.3.3. Análisis diferencial de genes mediante PCR en Tiempo Real

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador *CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad)*. Las condiciones generales de amplificación consistió en un ciclo inicial a 95°C durante por tres minutos (activación de la enzima y desnaturalización del ADN), seguido de 40 ciclos a 95°C durante tres segundos, (desnaturalización), 60°C durante 20 segundos (hibridación) y un ciclo a 72 °C durante 30 segundos (extensión).

Tras la amplificación, se incluyó un paso de disociación en el que se realiza una medida continua de la fluorescencia emitida en un rango de 65-95°C aumentando la temperatura 5°C/s. Este paso permitió identificar la presencia de dímeros y verificar la especificidad de la reacción analizando las curvas de disociación del amplicon.

Todas las reacciones se prepararon en microplacas de 96 pocillos, utilizando el kit comercial *Kapa SYBR® Fast qPCR Kit Master Mix (2x) Universal™ (Kapa)* en un volumen final de 10 µL, conteniendo 1 µL de ADNc como molde. Cada muestra se amplificó por triplicado.

3.3.4. Gene ontology GO

Para evidenciar los procesos biológicos entre los transcritos obtenidos del análisis de RNAseq, se realizó un análisis de sobre expresión de genes en categorías de *Gene ontology GO* (Young et al., 2010). Los genes fueron agrupados en categorías, que estaban sobre expresadas entre los genes expresados diferencialmente, mediante propiedades biológicas en común como: componente celular (GO_CC), procesos biológicos (GO_BP) y función molecular (GO_MF); luego evaluados y anotados mediante la herramienta bioinformática *GO Enrichment Analysis* (Huang et al., 2009).

3.4. Patrones de expresión: Expresión diferencial significativa

Para estudiar los patrones de expresión de los tratamientos T2A y T2B, se utilizó herramientas gráficas:

3.4.1. *Heatmap* o Mapa de calor

Se generó un *heatmap* o mapa de calor; el cual se elaboró mediante un algoritmo de seriación en la función *heatmap* del *software R* y *Cluster 3.0* (Eisen et al., 1998). Para representar gráficamente y comparar el nivel de expresión de los genes reportados en el análisis de RNAseq a 0 m en la superficie (T2A) y 10 m de profundidad (T2B).

3.4.2. *Volcano plot*

Otra representación gráfica de la expresión diferencial de los genes reportados a 0 m (T2A) y 10 m (T2B) en *M. pyrifera*, se realizó mediante el *volcano plot* (Jin et al., 2001; Cui y Churchill 2003; Li, 2012; Li et al., 2014), el cual se realizó usando el *software RStudios* v 0.99.09.

3.5. Análisis químico del agua de mar

Se realizó la colecta manual de las muestras de agua de mar en la superficie a 0 m (T2A) y mediante buceo autónomo a 10 m (T2B) de profundidad. El procedimiento metodológico para el análisis de nitrito, nitrato y fosfatos es el indicado por Strickland y Parson (1972).

3.5.1. Muestreo del agua de mar

La colecta se realizó en dos tipos de botellas, según los análisis químicos de agua de mar a realizar para ambos tratamientos o condiciones de muestreo T2A y T2B:

- Para los análisis de nutrientes como nitritos, nitratos y fosfatos, se colectó las muestras, en botellas de polietileno autoclavadas con capacidad de 15 oz. de boca estrecha con rosca, las botellas fueron enjuagadas dos veces con agua de mar antes de coleccionar la muestra y llenadas completamente.
- Para los análisis de otros parámetros como conductividad, salinidad, temperatura y pH; se usó botellas de vidrio de color ámbar de 10 oz. El transporte de las botellas se realizó en hielo para conservar la baja temperatura y en oscuridad.

3.5.2. Conductividad, salinidad, temperatura y pH

Se midió en el laboratorio utilizando un salinómetro que proporciona la relación de la conductividad de la muestra de agua de mar y la salinidad a una solución estándar de cloruro de potasio *KCl*. Los registros de temperatura y pH se realizaron con un termómetro de balde y un peachímetro respectivamente.

3.5.3. Determinación de nitritos

- Colocar 50 ml. de muestra en un erlenmeyer
- Adicionar 1 ml. de la solución de sulfanilamida y mezclar completamente
- Dejar en reposo por un tiempo de 2 a 8 minutos
- Adicionar 1 ml. de solución N1-naftiletildiamina dihidrocloruro y mezclar completamente
- Después de 10 minutos y no más de 2 horas medir la absorbancia a 543 nm.

3.5.4. Determinación de nitrato

- Colocar 100 ml. de muestra en un erlenmeyer
- Adicionar 2 ml. de solución concentrada de cloruro de amonio
- Mezclar completamente
- Colocar aproximadamente unos 25 ml. de la muestra en la columna reductora de cadmio
- Drenar aproximadamente 10 ml. a través de la columna reductora que servirá para la limpieza del cilindro donde se medirá la muestra.
- Colocar el remanente de muestra en la columna reductora de cadmio
- Drenar 15 ml. de muestra que servirá para la limpieza del erlenmeyer donde se va a recoger la muestra
- Recolectar 50 ml. de la muestra en un tiempo de cinco a ocho minutos
- Adicionar 1 ml de la solución de sulfanilamida
- Mezclar completamente
- Dejar en reposo por un tiempo de dos a ocho minutos
- Adicionar 1 ml de la solución de N1-Naftiletildiamina dihidrocloruro, mezclar completamente
- Después de 10 minutos y preferiblemente no más de dos horas, medir la absorbancia a una longitud de onda de 543 nm.

3.5.5. Determinación de fosfato

- Colocar 50 ml de muestra en frasco Erlenmeyer de 125 ml con probeta de 50 ml y adicionar 5 ml de solución mezcla de reactivo y agitar inmediatamente para que se mezcle completamente.
- Después de 5 minutos y preferiblemente dentro de las primeras dos a tres horas, medir la absorbancia de la solución en una celda de 1cm contra agua destilada a una longitud de onda de 885 nm, y utilizando filtro rojo.

3.6. Análisis químico proximal

Ocho plantas enteras de *Macrocystis pyrifera*: Cuatro individuos colectados en la zona intermareal a 0 m (T2A) en la superficie y cuatro colectados en la zona submareal a 10 m (T2B) de profundidad; fueron trasladados al laboratorio LMB-UNALM en bolsas oscuras y en hielo para mantener baja la temperatura. El alga fresca fue lavada con agua fría para eliminar impurezas como: Sales, epífitas, endófitas, sistemas de fijación (disco, grampon) y todo material extraño a las algas. Una vez lavadas, fueron almacenadas en congelación (-10°C).

3.6.1. Procesamiento de las muestras

En la Planta Piloto de Alimentos (TAPA) de la Facultad de Industrias Alimentarias – UNALM, se realizó el procesamiento de las muestras (Hernández-Carmona et al., 1999):

- Las algas limpias y húmedas se amasaron, se registró el peso inicial y fueron secadas en un horno de circulación de aire caliente a 60°C para determinar el porcentaje de humedad mediante diferencia de peso cada hora.
- El porcentaje de humedad de las algas fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad de las algas} = \frac{\text{Peso final del alga seca}}{\text{Peso inicial del alga húmeda}} \times 100$$

- Finalmente, las algas secas fueron molidas con un molino de martillo y tamizadas obteniéndose algas seca pulverizada con tamaños de partícula de 0.1 - 0.5 cm.

3.6.2. Extracción de alginato de sodio

Los pasos para la extracción del alginato de sodio según el método de Camacho y Hernández-Carmona, 2012 (modificado) fueron:

- Se rehidrataron 30 g de alga seca pulverizada durante una noche con 180 mL de agua destilada y 0.18 mL de formaldehído.
- La solución se filtró y el líquido fue descartado.
- Las algas fueron tratadas con 200 mL de solución de HCl a pH 4 durante 15 min y con agitación constante (Arvizu-Higuera *et al.* 1995).
- Después de la filtración, las algas fueron tratadas con 200 mL de solución de Na₂CO₃ a pH 10 y 60°C durante 6 h en baño María, con agitación constante a 300 rpm.
- El alginato extraído se filtró al vacío para separar el alga residual (principalmente celulosa), y el alginato en solución se precipitó con un volumen igual de etanol, agitando lentamente con una varilla de vidrio.
- Las fibras precipitadas de alginato se enrollaron a la varilla. Las fibras se removieron, se desenredaron, se lavaron con alcohol y se secaron a 50°C durante 24 h (Arvizu- Higuera *et al.* 1996).
- El alginato se pesó y el porcentaje de alginato se calculó con base en el peso inicial del alga.

3.6.3. Cálculo del rendimiento de biomasa y gel de alginato de sodio

El rendimiento en el proceso de extracción se refiere, al porcentaje de la muestra inicial (peso seco del alga) que se recupera como gel (peso seco del gel) según la siguiente fórmula (AOAC, 1990):

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso seco del gel obtenido (g.)}}{\text{Peso seco inicial del alga (g.)}} \times 100$$

3.6.4. Viscosidad del alginato de sodio

La viscosidad de las muestras a 0 m (T2A) y 10 m (T2B), se obtuvo preparando una solución de alginato al 1% y midiéndola con un viscosímetro *Brookfield* RVT, a 60 rpm, antes y después de añadir hexametáfosfato de sodio, el cual secuestra el calcio residual (Hernández-Carmona *et al.* 1999). La fórmula para el cálculo del porcentaje de viscosidad (AOAC, 1990) fue:

$$\% \text{ de Reducción} = (\text{Viscosidad inicial} - \text{Viscosidad final}) / \text{Viscosidad inicial} * 100$$

3.7. Análisis estadísticos

El análisis estadístico fue realizado mediante el software *InfoStat* v. 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008). Para los datos de peso húmedo, peso seco y porcentajes de rendimiento de biomasa y rendimiento del gel de alginato y viscosidad para ambos tratamientos (0 m y 10 m).

Los datos fueron procesados mediante el Análisis de varianza de una vía *ANOVA*, nivel de confianza 95 por ciento. Para la comprobación de supuestos se calculó la Normalidad de los residuales, la Homogeneidad de varianzas y en los tratamientos se comparó estadísticamente la Diferencia mínima significativa (siglas en inglés *LSD Least Significance Difference*) usando el Test de *LSD- Fisher* con un nivel de significancia del cinco por ciento. Se trabajó a partir de cuatro réplicas en cada caso.

3.8. Análisis de microscopia

Para identificar los polisacáridos de pared celular (alginatos), y previo al análisis en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), se realizó el análisis en Microscopia de alta resolución en campo claro de las muestras de tejidos lavadas procedentes de los filoides de *M. pyrifera* colectadas a 0 m en la superficie (T2A) y 10 m de profundidad (T2B).

3.8.1. Microscopia de alta resolución en campo claro

En la localidad de colecta, las muestras fueron fijadas con FAA (Formaldehído al 40 por ciento, alcohol al 70 por ciento y ácido acético glacial, proporciones 9:1:1), en el laboratorio se procedió a realizar los cortes transversales de los tejidos fijados y fueron procesados mediante una serie de lavados con alcohol etílico (70 por ciento – 50 por ciento – 30 por ciento) durante 10 min cada lavado, posteriormente se realizó dos lavados con tampón fosfato durante 10 min cada lavado, se realizó una postfijación con tetraóxido de osmio al 1 por ciento en agua destilada durante 4 horas, la deshidratación se realizó con batería de alcohol etílico en grado ascendente (30 por ciento – 50 por ciento – 70 por ciento – 80 por ciento – 96 por ciento) durante 10 min cada paso, se agregó acetona absoluto dos veces durante 20 min cada vez, el infiltrado se realizó con Epon Araldita-Acetona en proporciones de 1:3 durante dos horas, 1:1 toda la noche, 3:1 durante cuatro horas y Epon Araldita pura durante cuatro horas en 2 pasos.

La inclusión se realizó en molde de silicona para el tallado en cortes finos (0.1 μm -0.5 μm) con ultramicrotomo *Spence* MT4 con cuchilla de vidrio, el montaje y la coloración de los cortes sobre placas portaobjetos se realizó con azul de Toluidina al uno por ciento durante 10 min, se realizó el lavado y secado. Finalmente, se realizó en análisis y fotografiado con un microscopio de luz compuesto *NiKon* marca *ECLIPSE Ci*.

3.8.2. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Para el análisis de Microscopia electrónica de barrido MEB (*Scanning Electron Microscope* SEM), en la localidad de colecta, las muestras de tejidos lavadas procedentes de los filoides de *M. pyrifera* colectadas a 0 m en la superficie y 10 m de profundidad, fueron fijadas con FAA (Formaldehído al 40 por ciento, alcohol al 70 por ciento y ácido acético glacial, proporciones 9:1:1), en el laboratorio se procedió a realizar los cortes transversales de los tejidos fijados y fueron procesados mediante dos lavados con alcohol de 96° durante 10 minutos cada lavado, deshidratadas dos veces en etanol al 100 por ciento durante 20 minutos cada deshidratación.

Las muestras deshidratadas fueron secadas a punto crítico en un equipo *Microscopy Science* (Modelo: EMS8), para preservar la estructura celular. Las muestras fueron montadas en los porta muestras con cinta adhesiva conductoras de cobre reversible, recubiertas con oro mediante la técnica de *sputtering* en un equipo de iones SPI *Supplies* (Modelo: spi module *sputter coater* 114303-AX /spi module control vacío 2161_AX).

Las imágenes fueron observadas en un Microscopio electrónico de barrido TESCAN (Modelo Vega 3).

3.8.3. Microanálisis de Dispersión de Energía EDX

Se complementó el análisis MEB, con el Microanálisis por Dispersión de Energía (siglas en inglés *Energy Dispersive X - Ray* EDX) para determinar la composición química y distribución de los elementos como: carbono, sodio, calcio, azufre y oxígeno en unidades de porcentaje del peso y concentración atómica. El EDX se realizó en exactamente las mismas condiciones de análisis para ambas muestras; es decir, en los polisacáridos de pared (alginatos) de *M. pyrifera* se realizaron 3 lecturas centradas en la pared celular y en la zona cortical externa del parénquima en dos filoides colectados a 0 m en la superficie (T2A) y 10 m (T2B), respectivamente.

IV. RESULTADOS

4.1. Transcriptómica

Los resultados obtenidos de los análisis genéticos para el mapa global del transcriptoma de *M. pyrifera* fueron obtenidos para ambas condiciones de muestreo, a 0 m (T2A) y 10 m (T2B).

4.1.1. Extracción de ARN

4.1.1.1. Extracción y cuantificación de ARN para los análisis de *PCRq*

La extracción de ARN se realizó con el kit *RNAeasy mini kit* (Quiagen) según el protocolo establecido por el fabricante.

Una vez que se estandarizó y optimizó el protocolo de extracción de ARN total se procedió a su extracción en los tratamientos a 0 m (T2A) y 10 m (T2B). Con el RNA total extraído y purificado, se verificó la calidad del mismo con una electroforesis en gel de agarosa al uno por ciento *buffer MOPS* y se observó bandas definidas, con ausencia de degradación del ARN en cada tratamiento. Se usó el marcador de peso molecular *RiboRuler Ladder 200 bp* (Thermo Scientific™).

La cuantificación del ARN total se realizó mediante el espectrofotómetro *Nanodrop* (ND1000) a partir de muestras de dos μl . Se determinó el grado de pureza del ARN obtenido por las relaciones de las absorbancias de 260/230 y 260/280nm según el protocolo establecido. Las muestras de ARN extraído tuvieron una concentración de entre 0,5 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo que indica que el proceso de extracción de ARN total fue eficiente. Las muestras de ARN obtenidas en la extracción, para ambos tratamientos, presentaron valores

adecuados para la presente tesis doctoral; Sin embargo, es necesario asegurar que estas muestras no presenten ADN contaminante. Por esta razón, es imprescindible realizar el tratamiento del RNA extraído con la enzima *DNasa I* para eliminar la contaminación del mismo con ADN genómico. El tratamiento de purificación del ARN, se lo realizó con la enzima *DNase I* (ZYMO RESEARCH). Tabla 2.

Tabla 2. Medición de la concentración y pureza en las muestras de ARN de *Macrocystis pyrifera*, extraídas para los análisis de *PCRq*, usando el espectrofotómetro Nanodrop.

N#	Código	ng/ul	260/280	260/230	Volumen	Rendimientos	Pureza
1	M_0m	137,6	2.16	2.02	30 ul	4128	óptima
2	M-10m	296,5	2.19	2.12	30 ul	8895	óptima

4.1.1.2. Extracción y cuantificación de ARN para los análisis de *RNAseq*

Para los análisis del *RNAseq*, una alícuota de las muestras de ARN se corrió en el *Bioanalyzer chip RNA Agilent* para analizar la integridad y pureza de las muestras extraídas de *M. pyrifera* en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2B). Tabla 3.

Tabla 3. Medición de la concentración y pureza en las muestras de ARN de *Macrocystis pyrifera*, usando el espectrofotómetro *Nanodrop*. Laboratorio *Genotypic*. India.

N0.	Nombre de la muestra	Nanocrop Qc			Volumen ul	Rendimientos	Qubit Qc Pureza
		ng/ul	260/280	260/230			
1	SO_3451_Repl.0m	131.78	1.95	2.2	15	1976.7	óptima
2	SO_3451_Repl.10m	340.8	1.96	2.54	15	5112	óptima

4.1.2. Síntesis de ADNc por Transcripción reversa

4.1.2.1. Síntesis de ADNc por Transcripción inversa para los análisis de qPCR

La síntesis del cDNA se llevó a cabo mediante el uso de la enzima (M-MLV-RT) *Reverse Transcriptase* (PROMEGA). La síntesis se realizó con los dos µg de ARN que se trataron con la enzima DNasa I. La calidad del cDNA se verificó directamente con la PCR en tiempo real.

4.1.2.2. Síntesis de ADNc por Transcripción inversa para los análisis de RNAseq

Después de remover las secuencias de los adaptadores, los nucleótidos ambiguos y las secuencias de baja calidad; un total de 84, 726,760 lecturas limpias fueron generadas mediante secuenciamiento *Illumina*, conteniendo lecturas para la librería SO_3451_T2A para 0 metros (T2A) y lecturas para la librería SO_3451_T2B para 10 metros de profundidad (T2B) Tabla 4. El promedio del porcentaje en el contenido de GC para las lecturas limpias fue 53% en ambos tratamientos.

Tabla 4. Preparación de las librerías para el transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera* Laboratorios *Genotypic*. India.

N0.	ID Muestra	Concent. Qubit ng/µl	Vol. µl	Rendimiento ng	Código de barras	Secuencias de código
1	SO_3451_T2A_ePCR1_IL_T	2.85	18	51.30	TS-08	ACTTGA
2	SO_3451_T2B_ePCR1_IL_T	3.16	18	56.88	TS-09	GATCAG

Adaptador Universal 5'

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
ATCT

Adaptador Index 5'

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[INDEX]ATCTCGTATGCCGTC
TTCTGCTT

4.1.3. Diseño de *Primers* para PCR en Tiempo Real

Los *primers* específicos para cada uno de los genes fueron diseñados para generar fragmentos de aproximadamente de 100 bp a 150 bp, con una temperatura de fusión de 60°C a 60.5°C. El programa *PRIMER 3* dio como resultado cinco posibles pares de *primers*, de los cuales se escogió la primera opción para cada uno de los genes. ANEXO 4.

El análisis de las secuencias de los *primers* resultantes de los genes, para el transcriptoma global de *M. pyrifera* así como para la síntesis de alginatos y polisacáridos de pared, con el algoritmo *BLAST* nos dio como resultado buenos coeficientes de especificidad para cada una de las secuencias de los *primers* escogidos.

4.1.4. RNAseq ensamblaje del Transcriptoma *de novo*

Se generaron un total de 94,674,832 lecturas crudas mediante secuenciamiento *Illumina NextSeq 500*, las cuales fueron depositadas en los archivos de lectura cortas (*Short Read Archive SRA*) del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI con la accesión número PRJNA322132, y una tasa de error menor al 1 % (Grabher et al., 2011).

Después de remover las secuencias de los adaptadores, los nucleótidos ambiguos y las secuencias de baja calidad; un total de 84, 726,760 lecturas limpias fueron generadas mediante secuenciamiento *Illumina*, conteniendo lecturas para la librería SO_3451_T2A para 0 metros (T2A) y lecturas para la librería SO_3451_T2B para 10 metros de profundidad (T2B). El promedio del porcentaje en el contenido de GC para las lecturas limpias fue 53% en ambos tratamientos.

Usando el ensamblaje *de novo* mediante el software *Trinity*, las bases limpias fueron ensambladas en 43,952 transcritos para 0 metros (T2A) y 57,516 transcritos para 10 metros de profundidad (T2B); con un total en la longitud de los nucleótidos de 38,210,788 para 0 metros (T2A) y 45,109,937 para 10 metros (T2B).

El rango de longitud de los transcritos para T2A fue de 301 bp a 10,538 bp con un promedio de 869.4 bp y N50 de 1,159; para T2B fue de 301bp a 10,627 bp con un promedio de 784,3 bp y N50 de 986. Esos transcritos fueron posteriormente ensamblados en unigenes. El total de longitud de los unigenes es 35, 709,146 bp para T2A y 42, 444,101 bp para T2B, los cuales cubren el 93.45% y el 94.09% de la longitud de los transcritos respectivamente. Tabla 5.

Tabla 5. Resumen del ensamblaje *de novo* de *Macrocystis pyrifera*, tratamientos 0 m (T2A) y 10 m (T2B), empleando la herramienta *Trinity*.

Muestras	0 m (T2A)	10 m (T2B)
Herramienta usada	<i>Trinity</i>	
Hash/k-mer longitud	25	
Total de transcritos generados(contigs)	43952	57516
Rango máximo de longitud de transcritos	10538 bp	10627
Rango mínimo de longitud de transcritos	301bp	301 bp
Longitud promedio de los transcritos	869.4 bp	784.3 bp
Longitud media de los transcritos	2329 bp	441.5 bp
Longitud total de transcritos	38210788 bp	45109937 bp
Transcritos >=500 bp	25982	30709
Transcritos >1 kb	11756	12524
Transcritos >10 kb	2	1
N50 <i>value</i>	1159	986

Los valores más altos de N50 (1159 y 986 para 0 m (T2A) y 10 m (T2B) respectivamente, también indican la alta calidad del ensamblaje de las secuencias. Los COG's que usan CD-HIT también se han realizado para un ensamblaje adicional que produjo un total de 41,830 y 55,167 Transcritos representativos (TR) en T2A y T2B respectivamente; de los cuales un total de 16,398 RT (39.20%) de T2A y 21,646 RT (39.24%) de T2B fueron anotados con

éxito. Un total de 25,432 y 33,521 transcripciones de las muestras T2A y T2B permanecen sin anotación implicando nuevas funciones. Tabla 6.

Tabla 6. Resumen del análisis COG de *Macrocystis pyrifera* en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2B) empleando las herramientas *Trinity* más *Cdhit*.

Muestras	0 m (T2A)	10 m (T2B)
Herramientas usadas	<i>Trinity + Cdhit</i>	
Hash longitud		25
Total de transcritos generados (COG/ <i>Cluster</i>)	41830	55167
Total de transcritos anotados	16398	21646
Total de transcritos no anotados	25432	33521
Longitud máxima de transcritos	10538	10627
Longitud mínima de transcritos	301	301
Promedio de la longitud de los transcritos	853.7	769.4
Longitud media de transcrito	956	1830
Longitud total de transcritos	35709146	42444101
Transcritos >=500 bp	24366	28939
Transcritos >1 kb	10794	11511
Transcritos >10 kb	2	1
N50 <i>value</i>	1128	953

4.1.5. Anotación funcional de unigenes

Después de remover las secuencias de baja calidad y de longitud corta, se realizó un análisis de anotación para las muestras colectadas a 0 metros (T2A) obteniendo 83,660 unigenes no redundantes y para las muestras colectadas a 10 metros (T2B) 110,334 unigenes no redundantes en ambos casos se obtuvieron mediante secuencias coincidentes con la base de datos de proteínas *UNIPROT* empleando las secuencias de *Ectocarpus siliculosus* (Dittami et al., 2009). Los transcritos con más del 30% de identidad se tomaron para análisis posteriores.

Para 0 metros (T2A), el alto porcentaje de unigenes fue anotado en la base de datos *GO* (Ashburner et al., 2000), contabilizados por 41,830 de todos los unigenes, seguidos por 16,398 transcritos anotados *Nr* en el NCBI-BLAST v.2.2.31 (Altschul et al., 1990); entre los unigenes anotados exitosamente en la base de datos *Nr* con fuerte homología (E-value inferior a 10^{-30}) fue observado en 4,350 (26,53 %) unigenes y 14,665 (89,43%) secuencias coincidentes tuvieron alta homología con un E-value < 10^{-15} .

Para 10 metros (T2B), el total de transcritos con anotación *GO* fue 55,167 unigenes, seguidos por 21,464 transcritos anotados en el NCBI-BLAST (*Nr*); los unigenes anotados con fuerte homología (E-value inferior a 10^{-30}) fueron 14,858 (69,23%) secuencias y con un E-value < 10^{-15} representando una alta homología fueron 18,661 (86,93%) unigenes.⁷

De acuerdo a los términos *GO*, para 0 metros y 10 metros de profundidad un total de 16,398 y 21,646 genes fueron clasificados entre las tres categorías funcionales principales: Procesos biológicos, componentes celulares y función molecular. Fig. 4.

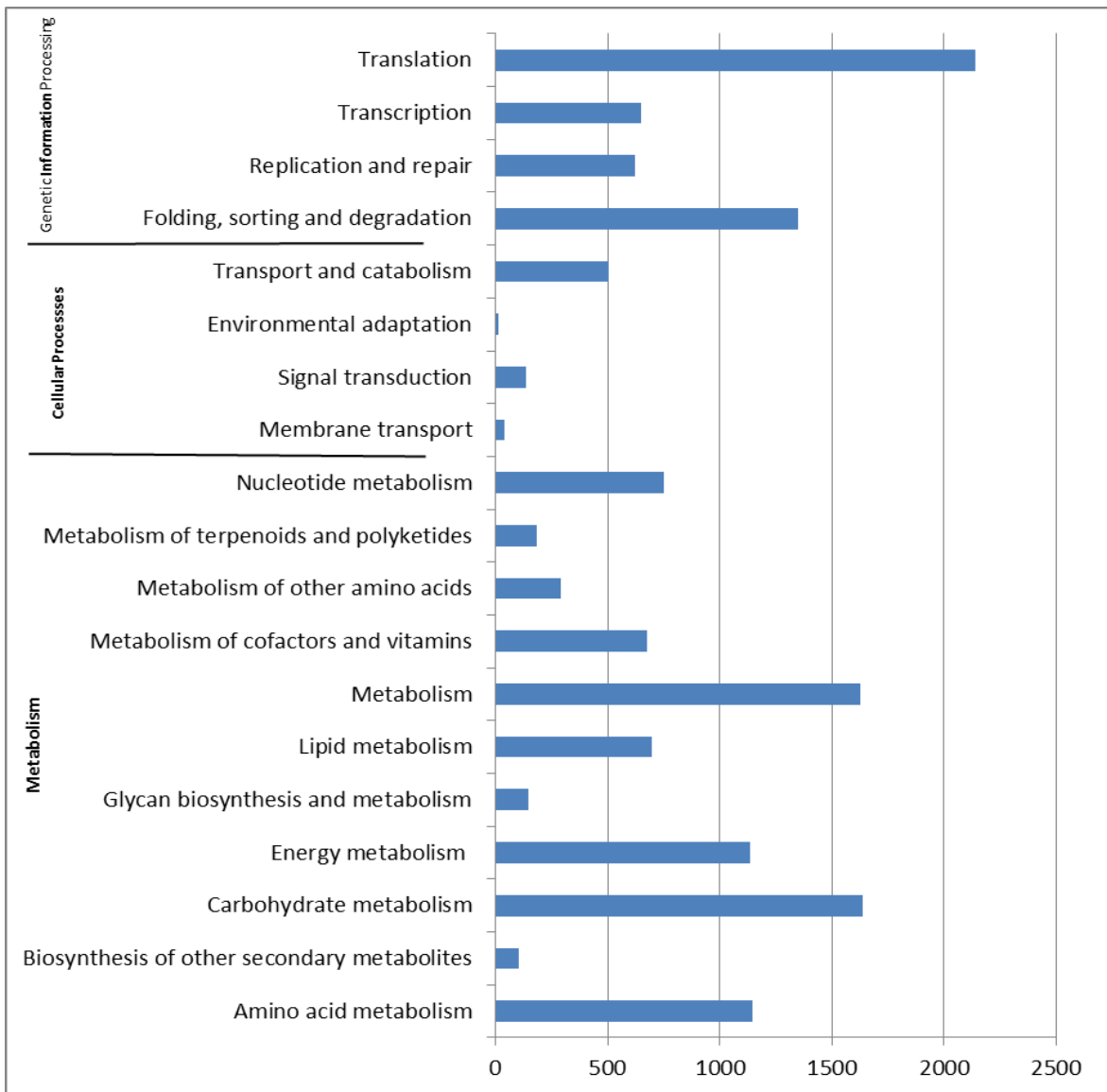


Figura 4. Clasificación *Gene Ontology* GO de unigenes del transcriptoma global de *Macrocytis pyrifera* a 10 m (T2B) de profundidad.

Entre los unigenes anotados, para la condición de 0 m (T2A), 13.75% están clasificados en la categoría de procesos biológicos, el 30.06% a componentes celulares y 56.21% corresponden a la función molecular Fig. 5. Para la condición de 10 m (T2B), el 15.6% de los unigenes se encuentran en la categoría de procesos biológicos, el 30.09 % corresponden a la categoría de componentes celulares y el 54.79% de los unigenes están agrupados en la categoría de función molecular Fig. 6.

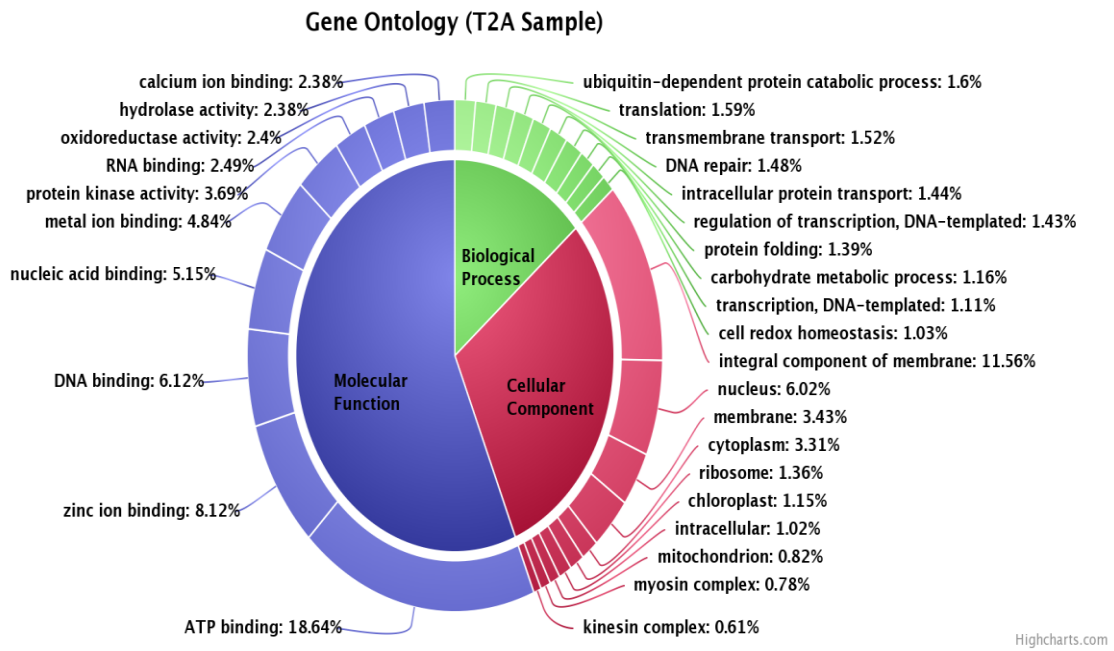


Fig 5. Representación gráfica del *Gene Ontology* GO de *M. pyrifera* que ilustra la Función molecular, Procesos biológicos y Componentes celulares. Condición T2A (0 m).

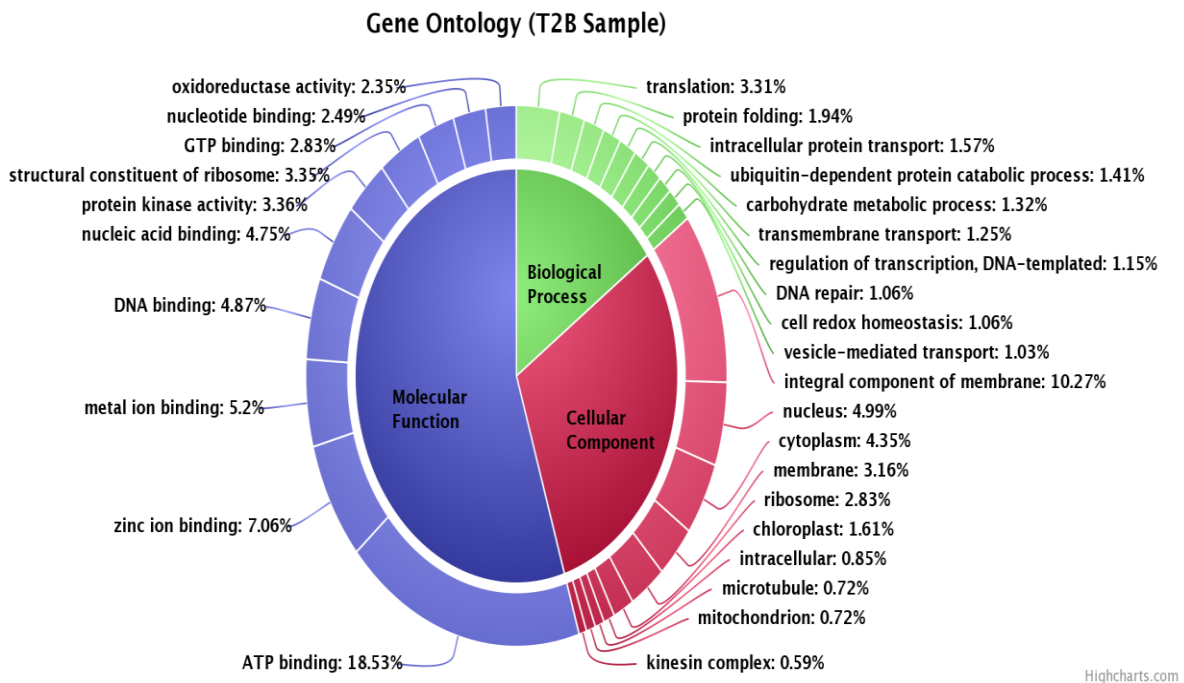


Fig 6. Representación gráfica del *Gene Ontology* GO de *M. pyrifera* que ilustra la Función molecular, Procesos biológicos y Componentes celulares. Condición T2B (10 m).

La condición de 0 m (T2A), la categoría de procesos biológicos fue agrupada en 10 subcategorías, de las cuales la de mayor porcentaje (1.6%) correspondió a los procesos catabólicos relacionados al control de las funciones subcelulares de las proteínas (*Ubiquitin-dependent protein*). La categoría de componente celular tuvo también 10 subcategorías siendo, las proteínas involucradas en los componentes integrales de membrana, la subcategoría que tuvo mayor representatividad (11.56%). En la categoría de función molecular, los genes de transporte fueron los más dominantes (18,64%). Fig. 7.

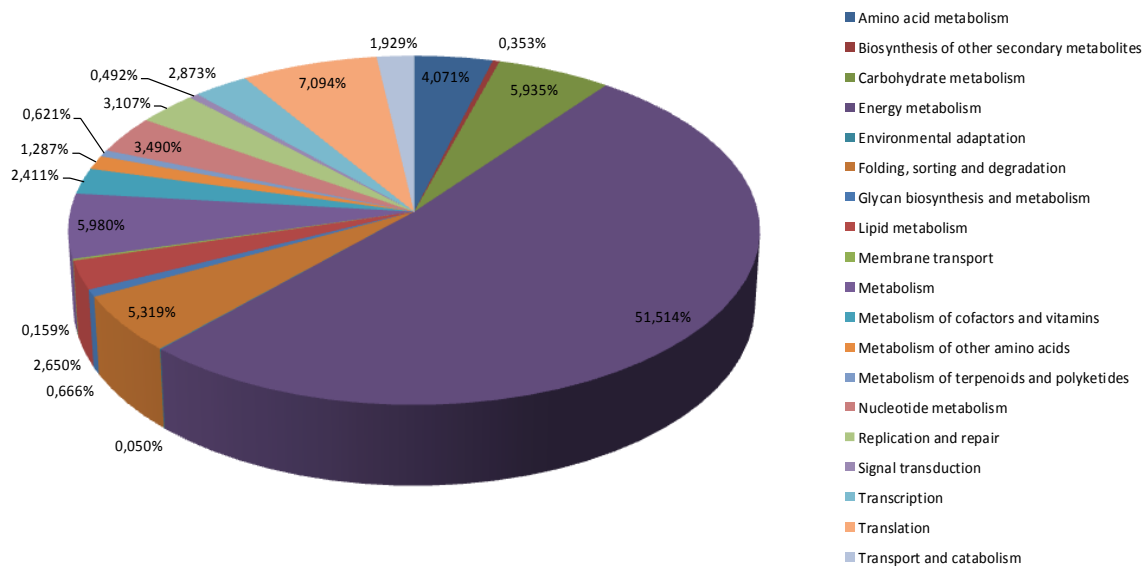


Figura 7. Distribución de los procesos metabólicos, fisiológicos y estructurales a nivel celular y molecular del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera*: Condición 0 m.

Para la condición de 10 m (T2B), la categoría de procesos biológicos y componentes celulares fueron subdivididas en 10 subcategorías, en donde los procesos biológicos que correspondían a procesos de traslación tuvieron mayor dominancia (3.31%), mientras que en los componentes celulares los componentes integrales de membrana fue la subcategoría de mayor representatividad (10.27%). En la función molecular, los genes de transporte fueron los más dominantes (18,53%). Fig. 8.

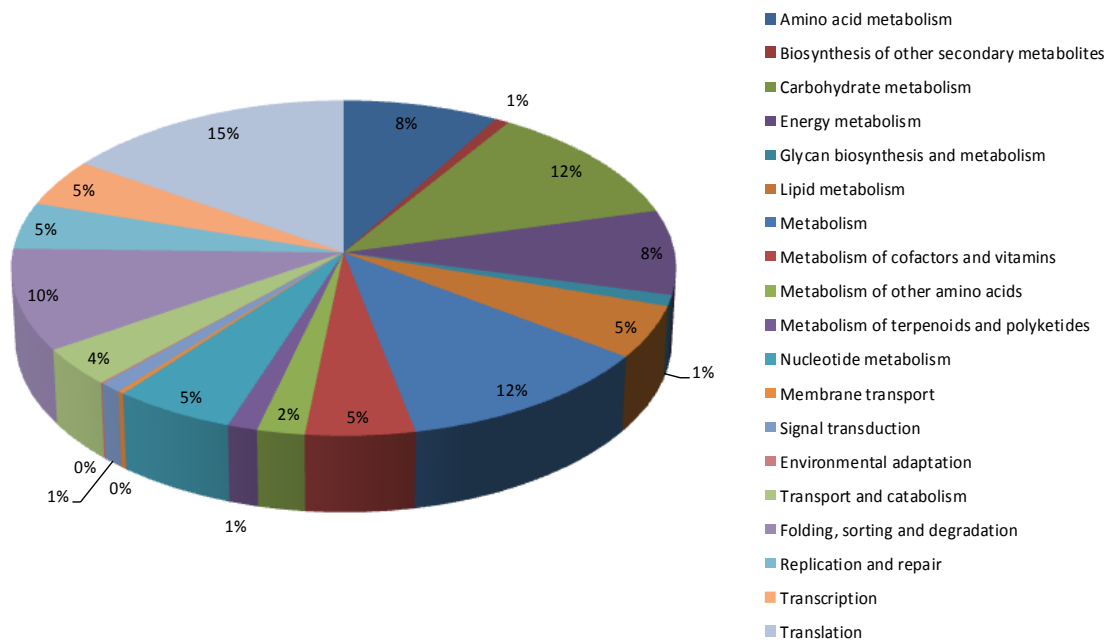


Figura 8. Distribución de los procesos metabólicos, fisiológicos y estructurales a nivel celular y molecular del transcriptoma global de *Macrocyctis pyrifera*: Condición 10 m.

Para identificar las vías metabólicas en *M. pyrifera*, se usó la base de datos KAAS (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>) empleando como organismos de referencia: *Micromonas sp. RCC299*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Cyanidioschyzon merolae* y *Galdieria sulphuraria*. Los unigenes para ambas condiciones 0 metros (T2A) y 10 metros (T2B) fueron asignados en 5 vías KASS que incluyeron: Metabolismo, procesamiento de información genética, procesos celulares, procesamiento de información ambiental y sistemas orgánicos.

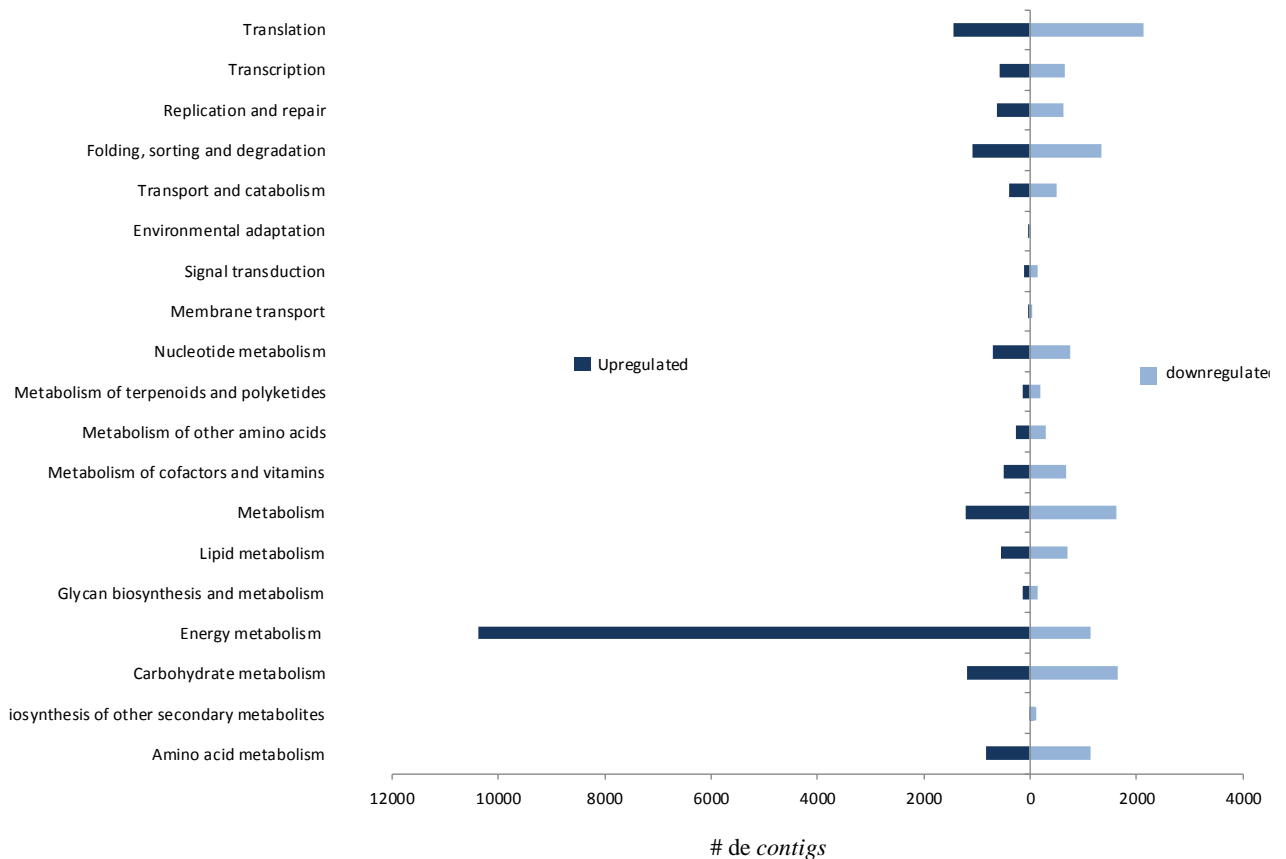
Para la condición T2A 10,363 unigenes fueron asignados con 59.19% para vías relacionadas al metabolismo, 35.72% para el procesamiento de información genética, 3.74% para procesos celulares, 1.26% para procesamiento de información ambiental y 0.09% para las vías relacionadas a los sistemas orgánicos.

Para la condición T2B 13,857 unigenes fueron asignados con 60.58% para el metabolismo, 34.37% para el procesamiento de información genética, 3.66% para procesos celulares, 1.27% para procesamiento de información ambiental y 0.12% para las vías

relacionadas a los sistemas orgánicos. Los unigenes anotados estuvieron involucrados en 50 vías metabólicas diferentes.

En la clasificación de las vías mediante KASS, en la condición de muestreo a 0 metros (T2A), el mayor número de unigenes se asigna a la vía de señal de traducción (1,427) representando el 13.77% del total de unigenes anotados, seguido por la vía de metabolismo (1,203) con 11.61% y metabolismo de carbohidratos (1,194) con 11.52%. En la condición de muestreo a 10 metros (T2B), el mayor número de unigenes anotados a través de KASS fue para la vía de señal de traducción (2,140) con 15.44%, seguida de la vía de metabolismo de carbohidrato (1,639) con el 11.83% y la vía para el metabolismo (1,625) con el 11.73%. Fig. 9.

Figura 9. Comparación de las categorías funcionales y el número de *contigs* del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera* a 0 m y 10 m. La figura muestra el número de *contigs* bajo-regulados a la izquierda y sobre-regulados a la derecha en cada categoría funcional. FDR \leq 0.05



4.1.6. Genes expresados diferencialmente

Para caracterizar las diferentes respuestas moleculares entre los tratamientos e identificar los genes expresados diferencialmente al estrés por condiciones intermareales, el análisis se realizó entre el grupo a 0 metros (T2A) y el grupo control de 10 metros (T2B) con q value < 0.05 , $FDR \leq 0.05$ y $Fold\ change \geq 1$. Un total de 9,519 unigenes expresados diferencialmente fueron identificados entre T2A y T2B, de los cuales 271 genes sobre-regulados y 264 genes reprimidos. Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de genes expresados diferencialmente durante la desecación en *Macrocystis pyrifera* en los tratamientos de 0 m (T2A) y 10 m (T2B). Anotación funcional de unigenes.

Regulación	Sobre-regulados	Bajo-regulados
Al menos 2 <i>fold change</i>	4,963	4,556
Significancia (P val* <0.05)	271	264
Significancia (P adj* <0.05)	27	30
Número de términos KO	271	264

*Obtendos con el programa DeSeq. P value = Valores estadísticamente significativos para esos cambios. P adj = P ajustado para múltiples pruebas usando el procedimiento Benjamini-Hochberg, los cuales controlan la tasa de falsos positivos (FDR).

En el análisis transcriptómico los *DGEs* fueron estimados mediante un análisis de *clusters* o agrupamientos jerárquicos de acuerdo a los niveles de expresión relativa ($\log_2 Fold\ change$) entre T2A y T2B. El agrupamiento jerárquico de los *DGEs* mostró patrones diferenciales entre los dos grupos, distinguiendo el grupo T2A del grupo control T2B.

Para identificar los más importantes mecanismos involucrados en la respuesta al estrés, nosotros clasificamos manualmente y examinamos en detalle 167 unigenes que exhibieron mayores cambios significativos en las condiciones de estrés comparado con el control T2B; estos genes fueron seleccionados con los criterios anteriormente descritos. La lista

completa de esos unigenes incluye su función putativa asignada manualmente, basada en las secuencias homólogas con secuencias correspondientes en las bases de datos públicas para proteínas (EMBL-EBI, UNIPROT, ECOCyC, EXPASY- ENZYME, SMART, BRENDA).

Del total de 167 unigenes como respuesta a las condiciones de 0 metros (T2A) y 10 metros (T2B) obtenidos, que incluyeron 31 unigenes para la síntesis de polisacáridos de pared, 92 unigenes de otras plantas y algas fueron homólogos a genes respuesta a nuestra condición de estudio. Entre ellos 36 unigenes fueron seleccionados, muchos de estos genes expresados, estuvieron relacionados con la síntesis de proteínas chaperonas (molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily) (Ireland et al., 2004; Henkel et al., 2008), transporte de electrones (Rieske 2Fe-2S), componentes esenciales en los procesos fisiológicos que incluyen enzimas para la fijación del carbono (*Fructose-bisphosphate aldolase*, *Glycine dehydrogenase*), síntesis de alginatos y celulosa (*Mannuronan C-5-epimerase*, *UDP-glucose 6-dehydrogenase*) (Roeder et al., 2005), metabolismo de aminoácidos (*Shikimate kinase*), los sistemas de transporte transmembrana (acuaporinas), genes que intervienen en la fijación de nitrógeno (*Glutamine synthetase*), procesos relacionados a la fotosíntesis (*Light harvesting complex protein*) (Konotchick et al., 2012; Strittmatter et al., 2016), vías de respuestas clásicas al estrés (*Vanadium-dependent bromoperoxidase*) (Roeder et al., 2005; La Barre et al., 2010; Konotchick et al., 2012; Strittmatter et al., 2016), replicación del ADN, síntesis de Aprataxina (FHA-HIT protein), metabolismo de ácidos grasos (*Lipoxygenase*) (Bouarab et al., 2004), estrés oxidativo (Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase), producción de fitohormonas (S adenosylmethionine synthase, Gibberellin 2-beta-dioxygenase), biosíntesis de ascorbato (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase) y otros procesos. ANEXO 5.

4.1.7. Análisis de enriquecimiento funcional GO y vías KEGG

Para los *DGEs* obtenidos entre las condiciones de 0 metros (T2A) y el control a 10 metros (T2B), las principales funciones moleculares fueron identificadas mediante el análisis de los términos *GO* y vías *KEGG*. Para T2A 1,232 diferentes vías fueron usadas, para T2B 1,373 vías diferentes fueron empleadas; el análisis de ontología de genes identificó 10,363 genes y 13,857 unigenes involucrados en 50 vías metabólicas conocidas.

4.2. Patrones de expresión: Expresión diferencial significativa

Para estudiar los patrones de expresión de genes en las muestras, a menudo es útil restringir el análisis a aquellos transcritos que se expresan diferencialmente de manera significativa en al menos una comparación de dos tipos de muestras. Dado un conjunto de transcripciones expresadas diferencialmente, extraer sus valores de expresión normalizados y realizar un agrupamiento jerárquico para reunir transcripciones con patrones de expresión similares en las muestras, y agrupar aquellas muestras que tienen perfiles de expresión similares según transcripciones resulta importante para representar gráficamente los datos de expresión diferencial significativa (Hass et al., 2013).

En la presente tesis, usando el ensamblaje *de novo* mediante el software *Trinity* se evaluó los cambios en la expresión génica entre los tratamientos a 0 m (T2A) y 10 m (T2B); para este objetivo se utilizó la herramienta *Deseq* (*Bioconductor Project*) el cual requiere del *software R* para la estadística computacional que genera transcritos expresados diferencialmente dando lugar a visualizaciones gráficas como *volcano plot*, *heat map*, diagramas de correlación (Hass et al., 2013). Fig. 10

Volcano plot

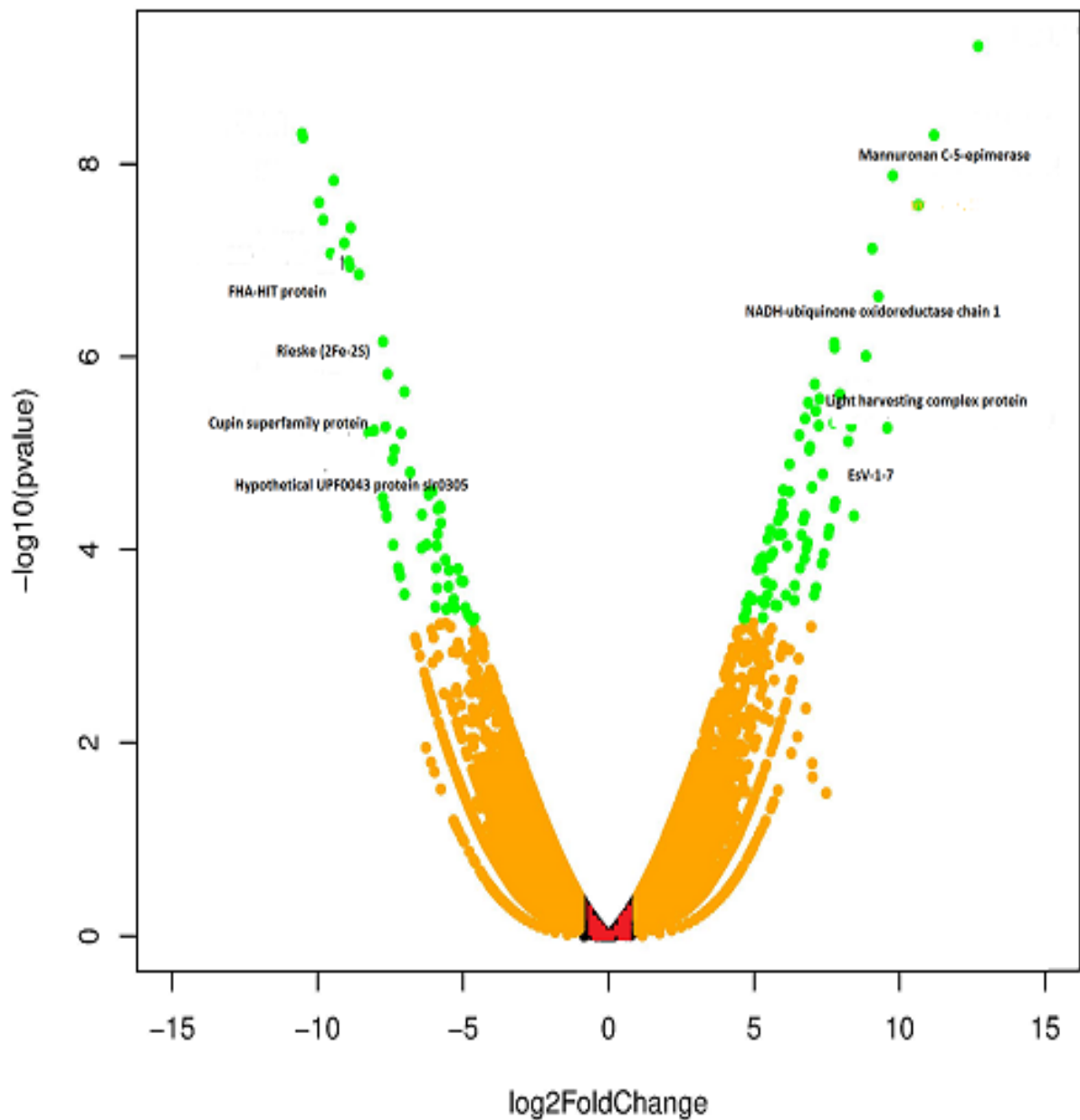


Figura 10. *Volcano plot* de los genes de *Macrocystis pyrifera*, expresados diferencialmente en las condiciones de 0 metros (T2A) y 10 metros (T2B). El color verde muestra la expresión de los genes, considerando su *fold change*. El color naranja representa los genes expresados neutralmente.

4.2.1. *Heat map* o mapa de calor

La agrupación jerárquica de los genes de *M. pyrifera*, expresados diferencialmente en las condiciones de 0 metros (T2A) y 10 metros (T2B), evidenció para la condición de 0 m (T2A), algunos genes con alta expresión o sobre-regulación entre los cuales podemos mencionar los involucrados en los mecanismos de transportación del agua e iones (acuaporinas) con un número de cambios o *fold change* de 30.4891. De igual forma, en los genes reportados para el estrés oxidativo (Vanadio dependiente bromoperoxidasa) el número de cambios fue igual a 6.8914. Genes como Rieske (2Fe-2S) región y *Light harvesting complex protein* se expresaron según el mapa de calor en *fold change* igual a 39.0188 y 16.4412. En la condición control a 10 m (T2B), varios genes fueron sobre regulados entre los que podemos mencionar las enzimas para la síntesis de alginatos y celulosa como el Mannuronan C-5-epimerasa presentaron un *fold change* de 0.0463 o 25 veces más expresados a 10 m, UDP-glucosa 6-dehidrogenasa 0.0557 o 17.95 veces más expresados en la condición a 10 m. Fig. 11.

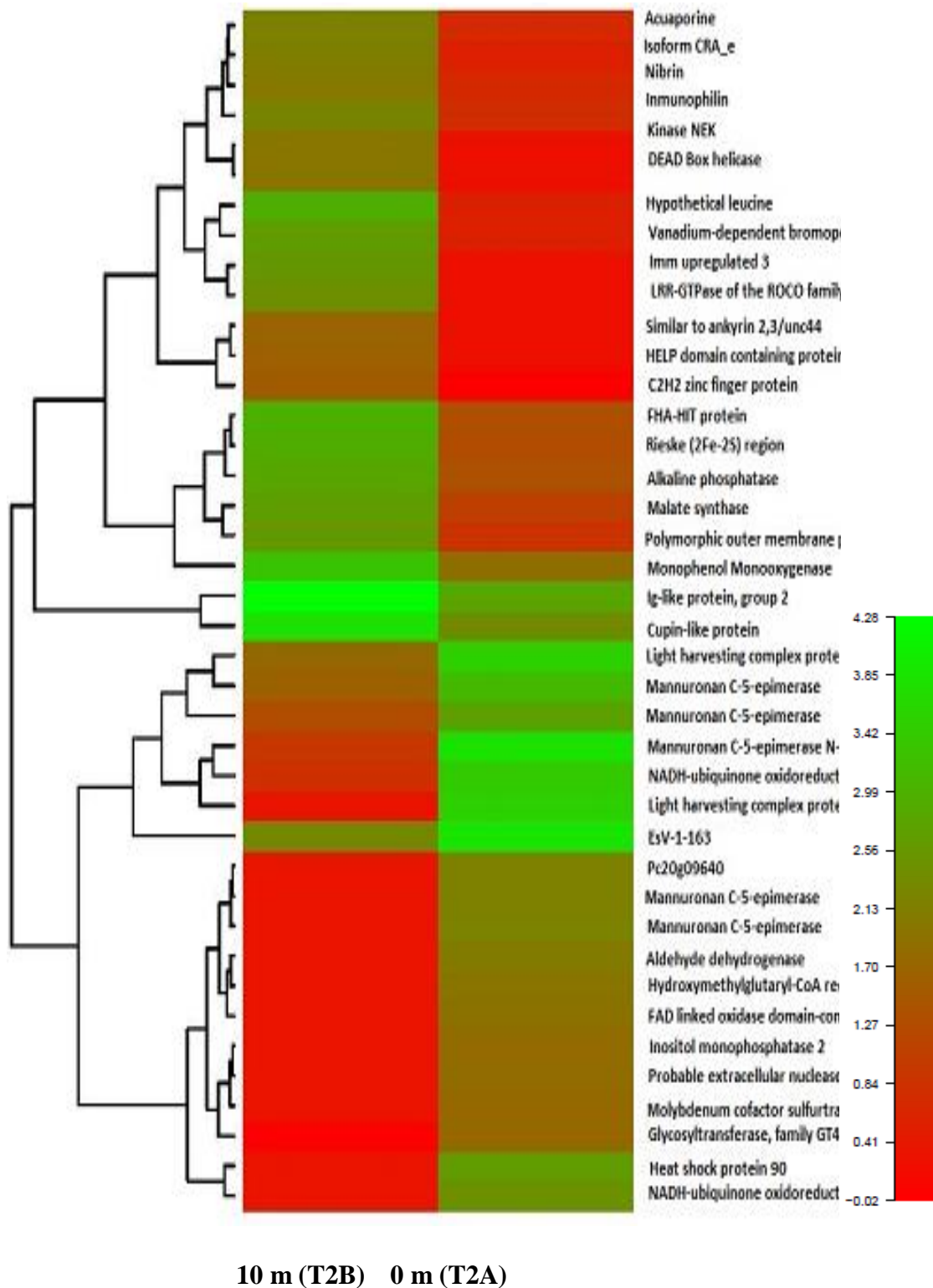


Figura 11. Heat map o agrupación jerárquica de los genes de *Macrocystis pyrifera*, expresados diferencialmente en las condiciones de 0 metros (T2A) y 10 metros (T2B). El color rojo muestra alta expresión y el color verde muestra baja expresión. La intensidad del color representa el log₂.

4.3. Análisis químico del agua de mar

El comportamiento de las principales variables oceanográficas indicó que los valores de conductividad fueron 56600 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para 0 m en la superficie (T2A) y 53300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para 10 m de profundidad (T2B). El pH registró valores de 7.54 para T2A y 7.32 para T2B. La salinidad, en condiciones normales fue de 35 y 34 ups respectivamente para 0 metros (T2A) y 10 metros de profundidad (T2B). La temperatura superficial media (TSM) registrada fue de 15.5°C para 0 m en la superficie (T2A) y la temperatura a 10 m de profundidad (T2B) fue de 14.5°C.

En los nutrientes como fosfatos se registró valores de 0.125 mg/L para 0 m en la superficie (T2A) y 0.132 mg/L para 10 m de profundidad (T2B), siendo el límite de cuantificación de 0.03 mg/L. Para nitratos las lecturas fueron 0.408 mg/L para 0 m (T2A) y 0.499 mg/L para 10 m (T2B), límite de cuantificación 0.03 mg/L. y para nitritos reportó 0.004 mg/L para 0 m en la superficie (T2A) y valores menores a 0.003 mg/L registrados para 10 m de profundidad (T2B) con un límite de cuantificación igual a 0.003 mg/L. Tabla 8.

Tabla 8. Análisis químico del agua de mar

Parámetros	Unidad	Límite de cuantificación	Tratamiento	
			0 m	10 m
Conductividad	$\mu\text{S}/\text{cm}$	1.0	56600	53300
pH	Unid. pH		7.54	7.32
Salinidad	ups	0.10	35	34
Temperatura	°C		15.5°C	14.5°C
Fosfatos	$\text{PO}_4\text{-3 mg / L}$	0.030	0.125 mg/L	0.132 mg/L
Nitratos	$\text{NO}_3\text{-N mg / L}$	0.030	0.408 mg/L	0.499 mg/L
Nitritos	$\text{NO}_2\text{-N mg / L}$	0.003	0.004 mg/L	< 0.003 mg/L

4.4. Análisis físico químico

Los resultados del análisis físico químico se detallan a continuación:

4.4.1. Cálculo del rendimiento promedio de biomasa y gel de alginato de sodio

En la extracción de alginato de sodio se obtuvo un rendimiento promedio de biomasa igual al 14.64 por ciento para el tratamiento de 0 metros en la superficie (T2A), mientras que el mayor rendimiento promedio fue de 17.71 por ciento obtenido para el tratamiento de 10 metros de profundidad (T2B). Estos resultados son estadísticamente significativos ($\alpha = 0.05$), existiendo una diferencia de 3.07% entre los tratamientos. Tabla 9.

Tabla 9. Análisis físico químico: Cálculo del rendimiento de biomasa de *Macrocystis pyrifera*

Códigos*	Peso seco	Peso húmedo	Rendimiento %	Promedios %
Mi1_0m	69,4	472,6	14,68	
Mi2_0m	81,7	425,3	19,21	14,64
Mi3_0m	88,1	613,1	14,37	
Mi4_0m	114,6	770,5	14,87	
Mi1_10m	140,6	809	17,37	
Mi2_10m	97,4	523,9	18,59	17,71
Mi3_10m	127,1	706,3	17,99	
Mi4_10m	70,9	419,5	16,9	

* **Mi_0m = *Macrocystis pyrifera* 0 m**

Mi_10m = *Macrocystis pyrifera* 10 m

El rendimiento promedio del gel de alginato de sodio para el tratamiento T2A fue 14.34 por ciento mientras que para T2B fue 17.55 por ciento. Tabla 10.

Tabla 10. Análisis físico químico: Cálculo del rendimiento promedio del alginato de sodio de *Macrocystis pyrifera*.

Códigos*	Peso seco Inicial (g)	Peso seco del gel (g)	Rendimiento %	Promedios %
Mi1_0m	14	2.05	14.64	
Mi2_0m	10	1.49	14.90	14,34
Mi3_0m	15	1.96	13.07	
Mi4_0m	30	4.51	15.03	
Mi1_10m	14	2.40	17.14	
Mi2_10m	10	1.66	16,60	17,55
Mi3_10m	15	1.96	13.06	
Mi4_10m	30	5.37	17.90	

* **Mi_0m = *Macrocystis pyrifera* 0 m**

Mi_10m = *Macrocystis pyrifera* 10 m

4.4.2. Viscosidad del alginato de sodio

La viscosidad promedio de la solución de alginato al 1% después de agregar el hexametafosfato de sodio, secuestrante de calcio, fue del 3.05 cPs para el tratamiento de 0 metros (T2A) y 17.22 cPs para el tratamiento de 10 metros (T2B); es decir 82.29% más alta que el tratamiento de 0 metros T2A. Fig. 12.

Adicionalmente se consideró una muestra comercial de alginato de sodio (Sigma-Aldrich^R. Saint Louis. USA), extraída de *Macrocystis pyrifera*, los resultados de los promedios obtenidos del porcentaje de reducción de la viscosidad de la muestra comercial, preparada en una solución de alginato al 0.7%, después de aplicar el secuestrante de calcio, y del tratamiento T2B (10 metros) fue 38. 38% para la muestra comercial y 19.21% para el tratamiento T2B. Tabla 11.

Tabla 11. Análisis físico químico: Porcentaje de reducción de viscosidad del alginato de sodio de *Macrocystis pyrifera*.

Muestra	Viscosidad inicial cPs ¹	Viscosidad final cPs ²	% Reducción de viscosidad	Promedios Reducción %
Mi1_0m	4.23	3.91	7.56	
Mi2_0m	3.28	3.26	0.61	6.45
Mi3_0m	2.24	1.99	11.16	
Mi4_0m	3.18	3.17	19.81	
Mi1_10m	21.88	15.92	27.24	
Mi2_10m	22.31	18.79	15.78	22.55
Mi3_10m	22.48	16.94	24.64	
Mi4_10m	21.11	15.87	24.82	
*Control	41.17	36.52	11.29	

***control al 70 por ciento de concentración de alginato.**

cPs¹ sin hexametáfosfato de sodio.

cPs² con hexametáfosfato de sodio.

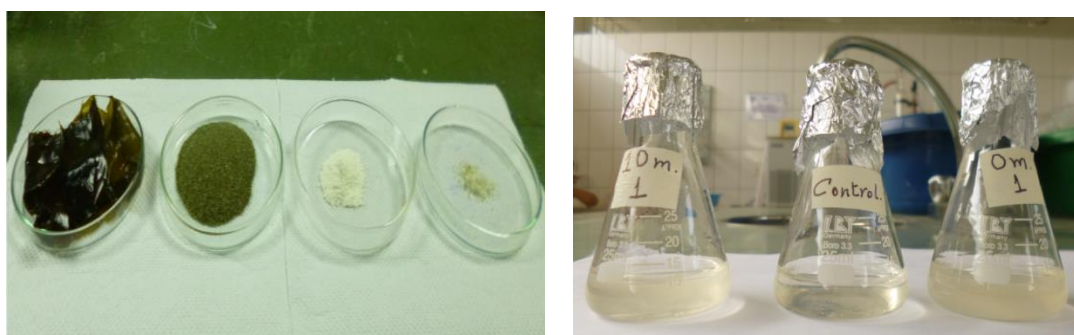


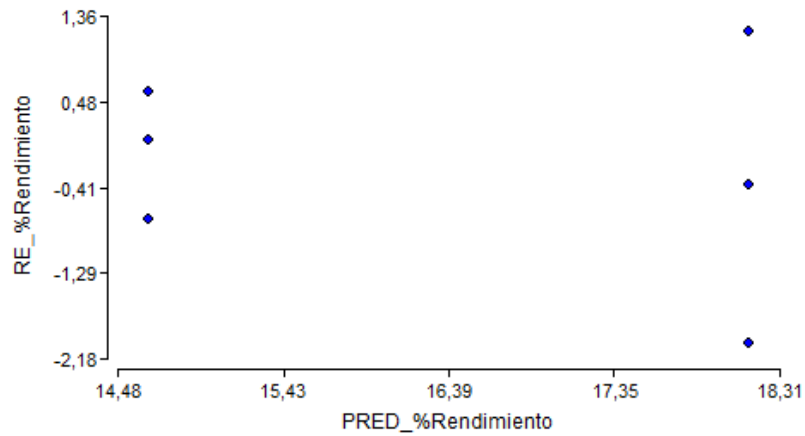
Figura 12. A la izquierda del texto se presentan muestras de *M. pyrifera* en: Frondas, pulverizada, alginato de calcio y alginato de sodio puro. A la derecha: Fiolas con alginato de sodio extraído de *M. pyrifera* colectadas a 0 m y 10 m para pruebas de viscosidad; en el centro se observa el control (muestra comercial).

4.5. Análisis estadísticos

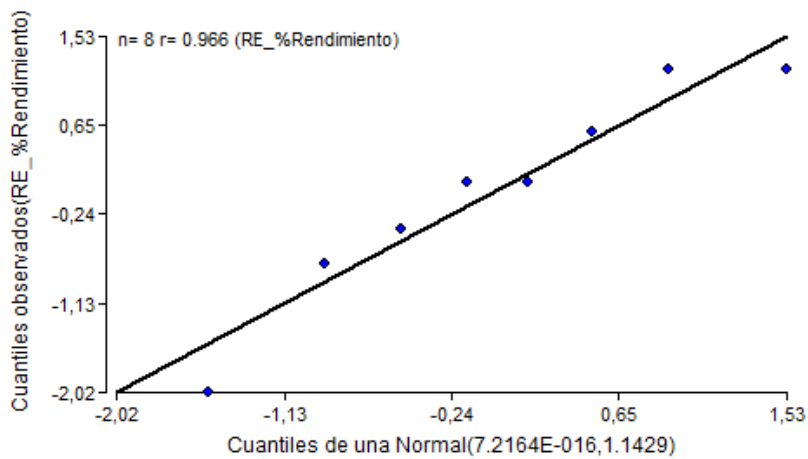
Los datos experimentales obtenidos del análisis químico proximal fueron sometidos al análisis estadístico indicando que ambos tratamientos a 0 m (T2A) y 10 m de profundidad (T2B) son estadísticamente significativos entre tratamientos y repeticiones ($p \leq 0.05$) y homogeneidad de varianzas ($R = 0.96$), al realizar el análisis con LSD

Fisher (ANOVA, $\alpha = 0.05$). Lo que significa que se rechaza la hipótesis nula que indica que no existen diferencias entre los tratamientos a 0 m en la superficie T2A y 10 m de profundidad T2B, inclinándose el resultado a favor de la hipótesis alternativa. Fig. 13. A- B - C.

A)



B)



Comparación entre tratamientos 0 y 10m. M. integrifolia

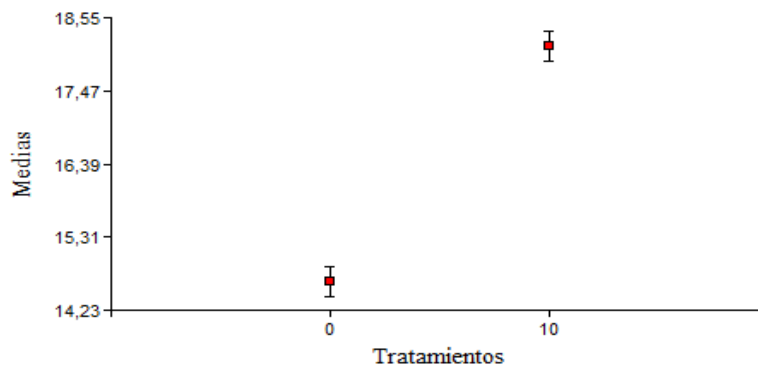


Figura 13. Análisis estadísticos de los rendimientos de la biomasa obtenida de *Macrocystis pyrifera* a 0 m y 10 m. A) Homogeneidad de varianzas ($R = 0.96$). B) Normalidad de los residuales. C) Análisis con LSD Fisher (ANOVA, $\alpha = 0.05$).

4.6. Análisis de microscopía

4.6.1. Microscopia de alta resolución en campo claro

Al observar un corte transversal del filoide en *M. pyrifera*, colectado a 0 m de la superficie (T2A), se reconoció una parte externa conocida como el parénquima, constituido por capas delgadas de células pequeñas y con mayor número de pigmentos o gránulos en abundantes cromatóforos; además, de una pared celular gruesa. A continuación se observó capas de células de mayor tamaño de forma rectangular y poligonales sin una disposición definida, estas células presentaban paredes celulares más gruesas que las células de la capa del meristodermo y formaban la zona cortical. Fig. 14. A – B. En el corte transversal del filoide colectados a 10 m, se observa una zona de menor grosor conformada por estructuras filamentosas que proporcionan una apariencia entrelazada y compacta, estas estructuras son las comúnmente conocidas como hifas, formadas de las células corticales internas y dan lugar a la zona medular. Fig. 14. C - D.

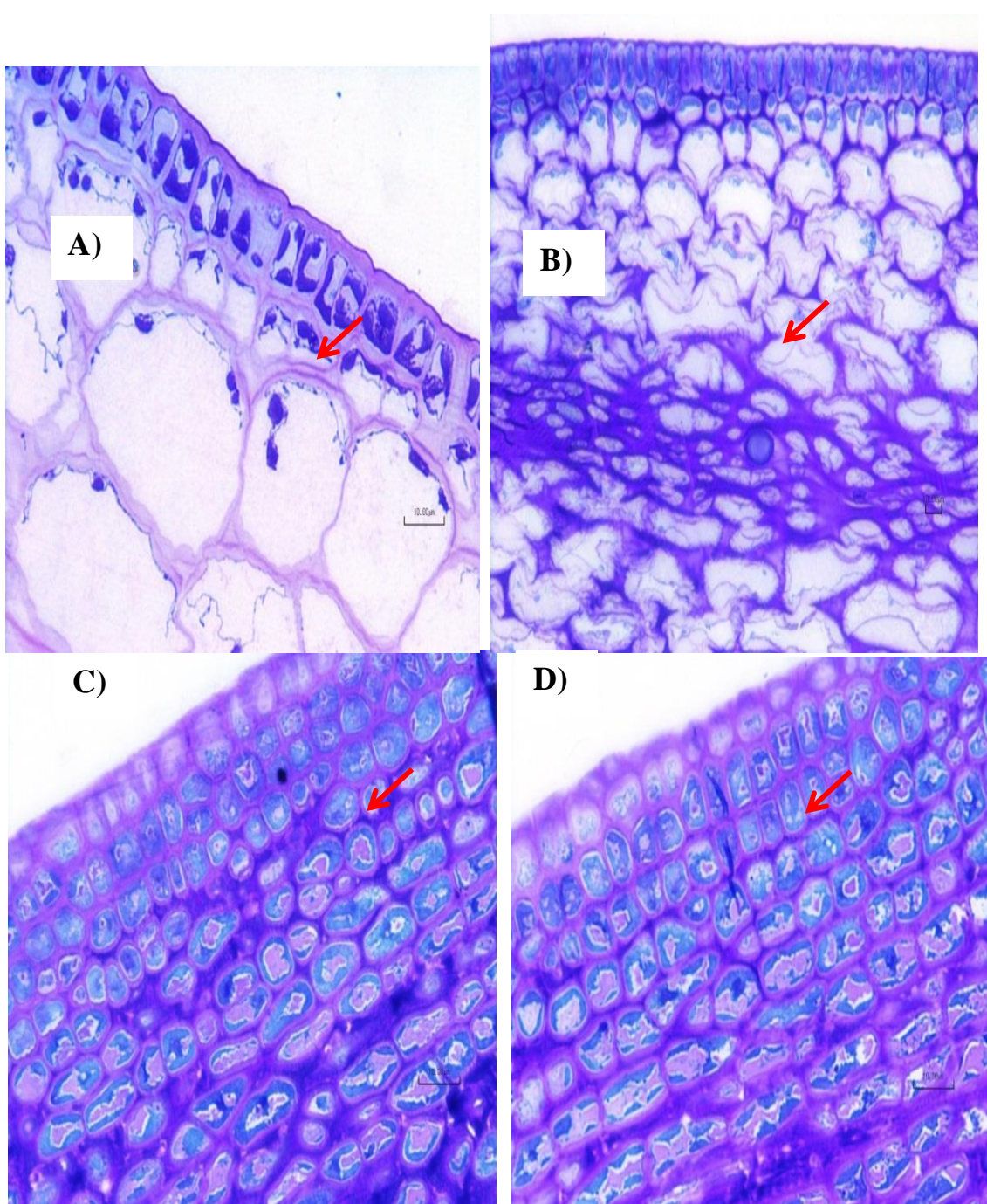


Figura 14. Comparación de la Microscopia de Alta Resolución en Campo Claro del filoide de *Macrocystis pyrifera*: Zona cortical. A) – B) Observación de la pared celular, parénquima y zona cortical de un corte transversal del filoide colectado a 0 m (T2A), nótese las células parenquimatosas vacías. C) - D) Observación de la pared celular, parénquima y zona cortical del filoide colectado a 10 m (T2B), se observa la presencia de polisacáridos de pared. Escala 10.0 μm . Flechas rojas indican células con ausencia o presencia de polisacáridos de pared.

4.6.2. Microscopia Electrónica de Barrido MEB

Al observar el corte transversal del filoide en *M. pyrifera*, para ambos tratamientos T2A y T2B, se reconoció tres zonas definidas: la zona meristemáticas, la zona cortical y la zona medular. Externamente el meristemo se encuentra constituido por una hilera de células rectangulares medianas. Seguido se observó zona cortical o células corticales representada por capas de células de mayor tamaño de forma rectangular, poligonales sin una disposición definida éstas células presentaban paredes celulares más gruesas que las células de la capa del meristodermo (Acosta, 1976). Fig. 15. A – B.

La zona medular aparece de menor grosor y conformada por estructuras filamentosas que proporcionan una apariencia entrelazada y compacta, estas estructuras filamentosas son las comúnmente conocidas como hifas, formadas por las células corticales internas, otros filamentos son los llamados filamentos trompetas de mayor tamaño que las hifas y constituyen áreas cribosas (Parker & Huber, 1965; Esau, 1969). En las células de las zonas meristemáticas y cortical se observaron en su interior numerosas estructuras lamelares con patrones trabeculares. Fig. 15. C – D.

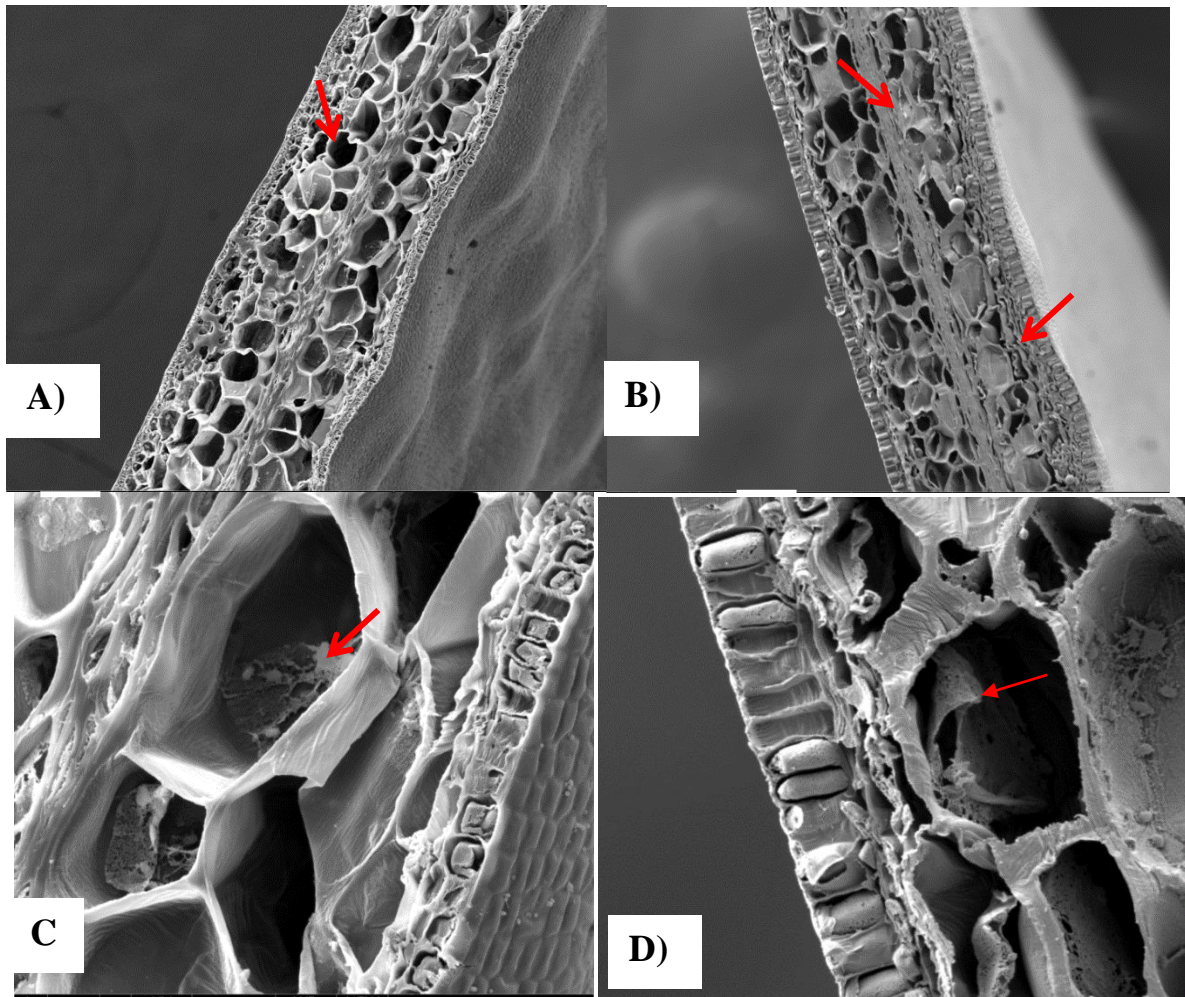


Figura 15. Comparación de la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de los polisacáridos de pared de *Macrocystis pyrifera*, condición 0 m (T2A) y 10 m (T2B). A) Observación MEB de la pared celular, parénquima y zona cortical de un corte transversal del filloide colectado a 0 m, nótese las células meristemáticas vacías. B) Observación MEB de la pared celular, parénquima y zona cortical del filloide colectado a 10 m, se observa la presencia de polisacáridos de pared a manera de estructuras trabeculares. C) y D) Magnificación 2600x para ambas condiciones. Vista detallada de los polisacáridos de pared a manera de láminas. Barras en las figuras A) – D) corresponden a la escalas a 5.0 μm . Flechas rojas indican las regiones seleccionados para el análisis EDX.

4.6.3. Microanálisis de Dispersión de Energía EDX

Según el análisis de EDX realizado en las estructuras lamelares de las muestras analizadas en T2A (0 metros) los valores promedios de las 3 lecturas realizadas en la pared celular para: El peso atómico (Wt) en el azufre fue de 1.51 por ciento y para sodio 3.97 por ciento; y para la composición atómica para azufre fue de 0.79 por ciento y para sodio 2.89 por ciento. En las lecturas registradas en el parénquima, los valores promedios del peso atómico (Wt) para el azufre fue 0.75 por ciento y para sodio 3.46 por ciento; y de la composición atómica para el azufre fue 0.41 por ciento y para sodio 2.59 por ciento. (ANEXO 2). Fig. 16. A - B.

En las estructuras lamelares de las muestras analizadas en T2B (10 metros), los valores promedios de las 3 lecturas en la pared celular para: El peso atómico (Wt) en el azufre fue de 1.02 por ciento y para sodio 2.68 por ciento; y para la composición atómica fue de 1.07 por ciento para azufre y 2.83 por ciento para sodio. En el parénquima, las lecturas promedios registradas del peso atómico (Wt) para el azufre fue 3.23 por ciento y para sodio 2.94; y de la composición atómica para el azufre fue 2.22 por ciento y para sodio 2.48 por ciento. (ANEXO 3). Fig. 16. C - D.

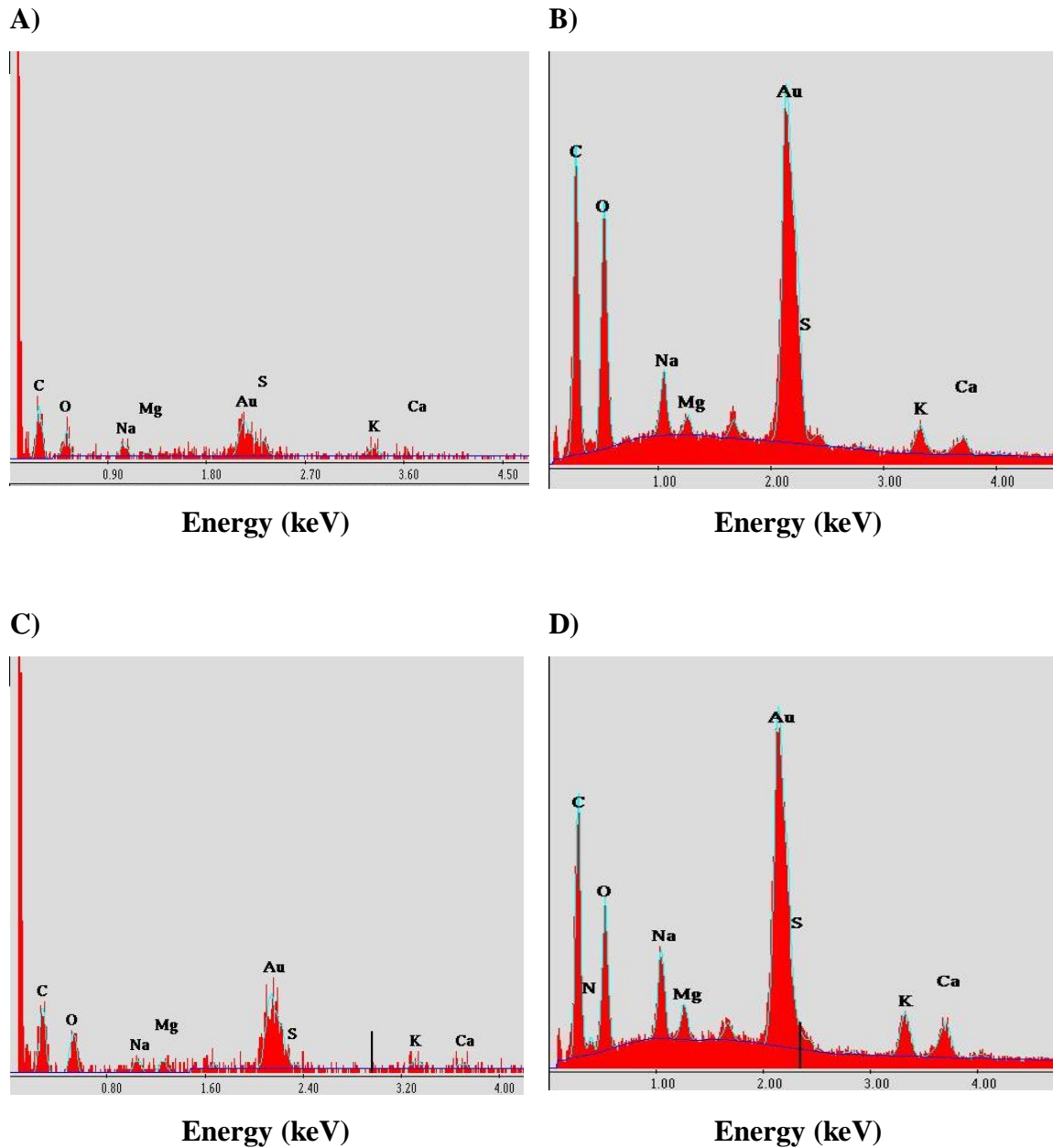


Figura 16. Comparación del análisis de EDX. Espectros de polisacárido a partir de los filoides de la pared celular y parénquima de *Macrocystis pyrifera*. Las regiones analizadas son las estructuras trabeculares de las zonas corticales observadas por MEB. Los picos de azufre (S) y sodio (Na), de ambas condiciones 0 m y 10 m, fueron obtenidos por los conteos de fotones. Pared celular: **A)** 0 m. S ($K\alpha= 2.0$ KeV), Na ($K\alpha= 1.0$ KeV) **B)** 10 m. S ($K\alpha= 2.4$ KeV), Na ($K\alpha= 1.2$ KeV). Parenquima: **C)** 0 m. S ($K\alpha= 2.1$ KeV), Na ($K\alpha= 0.9$ KeV). **D)** 10 m. S ($K\alpha= 2.5$ KeV), Na ($K\alpha= 1.3$ KeV).

V. DISCUSIÓN

5.1. Análisis transcriptómicos

La emersión de la marea expone a los organismos intermareales a una variedad de condiciones ambientales potencialmente adversas; por ejemplo, la luz, la congelación, la alta temperatura, la desecación, el choque osmótico y también hace que los nutrientes inorgánicos como el nitrato y el fosfato, obtenidos temporalmente del agua de mar, sean inaccesibles (Davison y Pearson, 1996; Burrit et al., 2002; Contreras-Porcia et al., 2011b; 2013). La distribución vertical de las macroalgas a lo largo del intermareal rocoso se encuentra influenciado por estas condiciones ambientales adversas, transformándose en estresores para las macroalgas (López-Cristoffanini et al., 2013).

La frecuencia y duración de esos estresores se incrementan por el cambio de las mareas. Los típicos patrones de elevación intermareal rocoso habitados por diferentes especies a distintos niveles, algunas veces separados sólo por centímetros, puede ser parcialmente explicados por diferencias en la tolerancia al estrés (Davison y Pearson, 1996). Globalmente nuestros resultados demostraron que la desecación producida por la baja marea, durante la condición T2A (0 m), indujo en *M. pyrifera* respuestas fisiológicas frente a esa condición de estrés abiótico.

Los alginatos y otros polisacáridos de pared actúan como barreras iónicas, cumplen una función estructural (Kloareg y Quatrano, 1988; Andrade et al., 2004; Salgado et al., 2005) e inducen la resistencia a bacterias y endófitas en las kelps (Palmer et al., 2005). En nuestro estudio, evidenciamos una respuesta diferencial a nivel molecular (transcriptoma) en *M. pyrifera* a 0 m (T2A) y 10 m de profundidad (T2B).

Diversos estudios han propuesto que el mecanismo de unión entre el alginato de pared celular y las sustancias fenólicas es mediada por la enzima *bromoperoxidase vanadio-dependiente* (VBPO) (Vreeland et al., 1998; Schoenwaelder, 2002; Arnold y Targett, 2003), se ha determinado la presencia de enzimas en muchas especies de algas phaeophytas y rodophytas (Shimonishi et al., 1998; Vreeland et al., 1998; Weyand et al., 1999; Colin et al., 2004) cuya función es la producción de compuestos orgánicos halogenados asociados con las defensas de las macroalgas contra los estresores bióticos (Dittami et al., 2009), nuestros resultados lo confirman al hallar una sobreexpresión del VBPO a 0 m (T2A) en *M. pyrifera*.

Durante la exposición al estrés por desecación el metabolismo del carbono y la relación entre los órganos que los sintetizan, son perturbados; así como, el metabolismo de los elementos que son absorbidos o asimilados con el agua. Las respuestas celulares incluyen: regulación osmótica, regulación de la circulación del agua (acuaporinas), protección o degradación de las proteínas y protección contra el estrés oxidativo (Timperio et al., 2008).

5.2. Metabolismo primario

La actividad enzimática producto del metabolismo primario se halla reprimida en la condición de T2A (0 m) en comparación con el control T2B (10 m), enzimas como: *Glutamate synthase (Ferredoxin-dependent)* (EC 1.4.7.1), *Glutamate synthase (NADH/NADPH-dependent)*, *Glutamine synthetase* (EC 6.3.1.2), *Pyruvate dehydrogenase* PDH (EC 1.2.4.1), *Fructose-bisphosphatase* (EC 4.1.2.13), *Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit)* (EC 4.1.1.39), enzima cuyas reacciones son independientes de la luz o Ciclo de Calvin, se encontraron expresadas en la condición control T2B (10 m).

La expresión de enzimas como la *Pyruvate dehydrogenase* (PDH) que participa en el metabolismo primario, pueden estar afectadas por el contenido interno de agua en los

tejidos (Contreras-Porcía et al., 2013) y es una enzima esencial para la descarboxilación oxidativa del piruvato a Acetyl CoA determinando la cantidad de carbono en el Ciclo del Ácido cítrico (Fierro et al., 2017); el PDH es un complejo enzimático que permite la producción de moléculas complejas durante condiciones ambientales estresantes y posterior recuperación mediante la producción de energía en forma de ATP, GTP, NADH y FADH₂ (Fierro et al., 2017). Adicionalmente; de acuerdo a los reportes sobre los procesos metabólicos y los transcritos de *E. siliculosus* durante los ciclos de luz y oscuridad, la expresión de estas enzimas, en especial la PDH, disminuyen durante el ciclo de luz e incrementando su expresión en fases oscuras (Dittami et al., 2008), nuestros resultados coincidentemente presentan expresión de estas enzimas involucradas en la condición T2B, es decir a profundidad de 10 m.

La expresión de la enzima *Aspartate Aminotransferase* (EC 2.6.1.1), que interviene en la fijación de carbono en los organismos fotosintéticos, se presentó reprimida en la condición T2A (0 m), el *Aspartate Aminotransferase* es considerado como un posible mecanismo de concentración de carbono, en condiciones de bajas cantidades de CO₂ (Dittami et al., 2008) y en el Ciclo del Ácido Tricarboxílico TCA, el cruce metabólico entre el metabolismo del nitrógeno y el carbono trabajan para la formación de estructuras de carbono, utilizadas como precursores en la biosíntesis de aminoácidos como el *aspartate*, *glutamate* y *alanina* (Dittami et al., 2008). La expresión de genes para la síntesis de polisacáridos de pared en el perfil transcripcional de *M. pyrifera*, presenta una sobreexpresión a 10 m de profundidad (T2B) donde las actividades relacionadas al metabolismo primario de las algas se observa en condiciones normales como la sobre regulación de *Fructose-bisphosphate aldolase* (E.C. 4.1.2.13), enzima que intervienen en las vías de glicólisis y gluconeogénesis.

La inmersión y emersión de las macroalgas producto de los cambios en el ciclo natural de las mareas, genera un desbalance en el potencial *redox* intracelular; una situación que puede ser controlada mediante una cascada coordinada de respuestas que son inducidas diferencialmente en cada condición de estudio (Contreras-Porcía et al., 2011b; 2013). La actividad fotosintética algal disminuye durante la exposición al aire para reducir los daños asociados por los subproductos fotosintéticos del estrés por desecación y

exposición prolongada a la luz UV (Contreras-Porcía et al., 2011b; Dinakar et al. 2011); en la fotorespiración enzimas como *Glycine dehydrogenase (Decarboxylating)* (EC 1.4.4.2), *Serine hydroxymethyltransferase* (EC 2.1.2.1) estuvieron sobrerreguladas en la condición control o T2B (10 m); lo que corrobora lo reportado en *Pyropia columbina* en donde las proteínas y RNAs relacionados a la fotosíntesis está bajo regulada durante períodos de estrés por desecación (Contreras-Porcía et al., 2013; López-Cristoffanini et al., 2015), en nuestros resultados se encontró baja regulada la enzima *Magnesium chelatase subunit H, putative chloroplast* (EC 6.6.1.1) que interviene en la vía para la biosíntesis de clorofila A de organismos dependientes de la luz y aeróbicos

En *M. pyrifera*, nuestros resultados demostraron que durante en la condición T2B (10 m), los genes que se expresaron predominantemente estaban involucrados en el metabolismo energético; las proteínas que formaban parte de este metabolismo fueron *NAD(P)H-Nitrate reductase* (EC 1.7.1.1), *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1/ NADH dehydrogenase (Ubiquinone)* (EC 1.6.5.3), *Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)* (EC 1.1.1.34), *Long-chain acyl-CoA synthetase, Udp-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase, GADPH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (EC 1.2.1.12); que en teoría, fueron los mecanismos de tolerancia requeridos para amortiguar los efectos del estrés que imponen un costo energético (Zagdańska, 1995); la aclimatación al estrés oxidativo depende de una gran disponibilidad de NADPH y ATP, ya que la mayoría de las reacciones químicas metabólicas demandan energía; por ejemplo, el sistema mediado por Ubiquitina para la degradación de proteínas intracelulares es ATP dependiente en todos los organismos (Ciechanover et al., 1984). De igual manera, la estructura de la cromatina es también ATP dependiente y está ligada cercanamente a la expresión de los genes, participando activamente en la regulación transcripcional (Luo y Dean 1999). Se ha demostrado que una mayor producción de energía a través de las mitocondrias durante la hidratación permite el mantenimiento de la homeostasis durante el estado *redox* y como resultado una condición fisiológica saludable en los períodos de desecación e hidratación (Mittler et al., 2004; Toldi et al., 2009).

Algunos otros genes inducidos en el metabolismo primario de *M. pyrifera*, son *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPC) que interviene en las vías celulares para la

producción de precursores de aminoácidos a partir de piruvato y que proporcionan el NADPH necesario para los procesos de biosíntesis y antioxidantes (Doubnerová y Ryslavá 2011); la actividad enzimática de esta proteína fue detectada en la condición T2A (0 m); aunque su actividad es baja, se sustenta en la descarboxilación enzimática en las plantas C4 por el *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPC) genera CO₂ para la fijación del *Ribulose biphosphate carboxylase* (RuBisCO) en el primer paso del Ciclo Calvin (Akagawa, 1972), lo que sugiere la activación de mecanismos de respuesta antioxidantes en *M. pyrifera*. Se detectó una disminución en el nivel de expresión del gen que codifica para *light harvesting complex protein*, este gen se relaciona con la reducción de la fotorespiración en condiciones de desecación (T2A), la *light harvesting complex protein* es una proteína implicada en la fotosíntesis (Dittami et al., 2009).

Otros genes inducidos durante la condición T2A (0 m) fueron *Serine/threonine-protein kinase* CTR1, *Serine/Threonine Dehydratase* (EC 4.3.1.-) *L-serine ammonia-lyase* se ha propuesto que estos genes son considerados como marcadores confiable de la fotorespiración (Foyer et al., 2003; Igarashi et al., 2006) y dependiendo de la disponibilidad de CO₂ y O₂ estos genes indican un aumento o disminución de la fotorespiración y han sido reportados como sobre expresados en condiciones de estrés salino (Dittami et al 2009). Además, se detectó la inducción de otros genes que sintetizan aminoácidos: *Branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit*, *Casein kinase II alpha subunit* y *Shikimate Kinase* (EC 2.7.1.71).

El presente estudio permitió identificar 34 genes involucrados en el metabolismo primario de *M. pyrifera*, expresados durante la condición T2A (0 m) de los cuales una gran parte recayeron en categorías GO relacionadas con el metabolismo energético (catabólico y anabólico), lo que indica una adaptación activa de *M. pyrifera* en condiciones de desecación. La activación masiva de genes implicados en procesos metabólicos durante la exposición de *M. pyrifera* en condiciones de desecación, sugiere una respuesta adaptativa y la activación de mecanismos de “tolerancia” a estresores ambientales adversos.

5.3. Metabolismo antioxidante

Como consecuencia de largos períodos de desecación caracterizados principalmente por la disminución de agua; las algas presentan una producción intracelular y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual resulta en un estrés oxidativo (Contreras-Porcía et al., 2005, 2007, 2009, 2011b, 2013; Liu et al., 2014; Kumar et al., 2010; 2011) varias enzimas antioxidantes pueden ser producidas durante los períodos de desecación e hidratación, para atenuar el estrés oxidativo por ejemplo: la HSP 70, la *glutathione S-transferasa* fueron expresadas durante la desecación, condición T2A.

Las proteínas de choque térmico (*Heat shock protein Hsp*) juegan un papel importante en la respuesta celular frente a estresores abióticos y por lo tanto son de importancia en la recuperación y supervivencia de los organismos (Sorensen et al., 2003). La expresión de Hsp70 estuvo sobreexpresada en la condición de 0 m, esto coincide con lo reportado en macroalgas rojas como *Porphyra columbina* que presentó una sobreexpresión durante la desecación (Contreras-Porcía et al., 2013); en macroalgas pardas como *Fucus vesiculosus* y *Fucus serratus* ha sido reportado en respuesta al estrés abiótico (Pearson et al., 2010). El estrés por desecación incrementa la producción de proteínas de choque térmico (HSP) estos grupos de proteínas son posible chaperonas de tolerancia a la desecación que evitan la agregación de macromoléculas y mantienen la adecuada conformación y función de otras proteínas (Timperio et al., 2008; Toldi et al., 2009); también intervienen en el mantenimiento de la estabilidad celular debido a que han sido asociadas a estructuras celulares internas como el citoesqueleto (Hoekstra et al., 2001).

Una de las familias de enzimas claves para la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés ROS) es el glutatión peroxidasa (Roeder et al., 2005); la cual es una enzima antioxidante y juega un papel importante como respuesta a diferentes tipos de estrés (De Franco et al., 2008), se expresan bajo condiciones de estrés oxidativo en plantas terrestres (Mittler et al., 2002), para la condición T2A (0 m), encontramos genes que sintetizan enzimas como la *Gamma-glutamyl transpeptidasa* y la *Glutathione*

S-transferase (EC 2.5.1.18) que interviene en el metabolismo del Glutati3n (Dittami et al., 2008). Hallamos una regulaci3n expresada en la condici3n T2B (10 m) de genes involucrados en la conversi3n de energa y metabolismo general, evidenciado en nuestros an3lisis mediante la expresi3n de genes como la *Glycine dehydrogenase*, *Serine hydroxymethyltransferase* que intervienen en las vfas de la fotorespiraci3n y disponibilidad de carbono. La capacidad para monitorear la respuesta de los genes regulados es esencial para identificar los diversos pasos que lideran desde la percepci3n del elicitador a su activaci3n de la maquinaria oxidativa para la inducci3n de la defensa (Potin, 2008).

Se ha sugerido que la depresi3n metab3lica experimentada durante la desecaci3n restringe la energa disponible para la sntesis de protefnas de estr3s hasta la inmersi3n (Chapplea et al., 1998). Adem3s de la energa necesaria para su sntesis, la funci3n de muchas protefnas de estr3s incluyendo las Hsp70, 90 que requieren Adenosin trifosfato ATP (Lewis y Pelham, 1985). Los procesos fisiol3gicos y bioqufmicos en plantas sometidas a sequfa conducen a una reducci3n de la actividad fotosint3tica causada por el cierre estom3tico y tambi3n a alteraciones en el metabolismo del carbono; el efecto de la sequfa sobre la tasa global de respiraci3n tisular o actividad respiratoria en las plantas varfa, increment3ndose en algunos casos o permaneciendo constante, segun la duraci3n e intensidad de la sequfa (Brown y Thomas, 1980; Hitz et al., 1982).

La producci3n de mol3culas antioxidantes importantes como el ascorbato, ha sido reportada en *Gracilaria corticata* (Kumar et al., 2011) y correlacionada por L3pez Crotoffanini et al., 2015 en la producci3n de enzimas involucradas para la sntesis de ascorbato como la *phosphomannomutase* y *GDP-D-mannose-3',5'epimerase*, las cuales fueron reportadas con una baja expresi3n o ausencia en la activaci3n de enzimas antioxidantes durante el estr3s por desecaci3n (Contreras- Porcia et al., 2016); nuestros resultados evidencian la presencia de enzimas como Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8), *L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase* (E C 1.3.2.3) que participan en la vfa de sntesis del ascorbato y se encuentran expresadas en la condici3n de 10 m.

Los compuestos fenólicos, fueron descritos como componentes de los alginatos en la pared celular de algas, estos compuestos juegan un papel importante en muchos procesos fisiológicos, como la protección de las células de las algas contra la radiación ultravioleta (UV), la inhibición de la herbivoría, el bloqueo de la polyspermia, la unión de metales pesados y la adhesión de esporas (Berglin et al., 2004; Ceh et al., 2005; Bitton et al., 2006). En la condición de 0 m (T2A), se detectó la inducción del gen *Monophenol Monooxygenase* una tirosinasa implicada en la biosíntesis de betalainas, pigmentos fotoprotectores cuya función es la absorción de la luz ultravioleta (UV) y protección contra el herbivorismo, se ha reportado que las betalainas poseen la propiedad de eliminar los radicales libres y actúan como fotoprotectores en las plantas contra el estrés oxidativo (Strack y Schliemann, 2003).

En las algas marinas, un incremento en la producción de iodo, bromo o compuestos orgánicos clorados está asociado con el estrés oxidativo inducido por el exceso de luz (Mtolera et al., 1996), la exposición a la luz ultravioleta UV (Laternus et al., 2004), debido a cambios en la temperatura (Abrahamsson et al., 2003) o por explosión oxidativa bajo condiciones de estrés provocadas por la pérdida de agua (Contreras-Porcía et al., 2016).

Los organismos marinos, y especialmente las macroalgas, han sido conocidas por largo tiempo en concentrar haluros desde su ambiente en condiciones de estrés (Leblanc et al., 2006; Le Barre et al., 2010). Genes como el *Vanadium- dependiente bromoperoxidasa* vBPO y el iodoperoxidasa vIPO han sido caracterizados representando familias de multigenes en *Laminaria digitata* (Colin et al., 2004); en nuestro estudio, la comparación entre los diferentes grupos de genes a 0 m (T2A) y 10 m (T2B), mostró una sobrerregulación de unigenes relacionados al estrés oxidativo a 0 m representado por el *Vanadium-dependent bromoperoxidase* vBPO. Los genes vBPO están relacionados con la función de defensa, tales como la halogenación de compuestos orgánicos producto de la capacidad de acoplar las reacciones oxidativas resultantes de la exposición de la luz solar y de la exposición al aire; así, los organismos marinos utilizan

especialmente el bromo para aumentar la actividad biológica de los metabolitos secundarios y en el caso de las algas pardas del orden Laminariales acumulan además yodo para las adaptaciones fisiológicas contra el estrés (Le Barre et al., 2010).

Los cambios observados durante el estrés hipersalino ocurrido en la desecación en *M. pyrifera*, se evidenció en la condición de T2A (0 m) con la sobre expresión de la *Urease accessory protein UreF*, que actúa como osmolito responsable de cortas adaptaciones frente al estrés salino (Dittami et al., 2009). La inducción del gen *Oxidoreductase (Arsenate reductase. Glutaredoxin)* que codifica la actividad antioxidante en la condición T2A (0 m) se detectó como respuesta al estrés oxidativo y juega un papel importante en la protección en el daño oxidativo (Rodríguez-Manzaneque et al., 1999). El aumento en la expresión del gen Ankyrin o proteínas periféricas de membrana, sugiere la interacción de estas enzimas con el exterior al estar ubicadas en la periferia de la membrana; se ha reportado fuertes cambios en transcritos de Ankyrin sometidos a estrés oxidativo (Dittami et al., 2009).

La enzima *glutathione S-transferase*, forma parte de un sistema complejo para tolerar la desecación reduciendo las moléculas de radicales libres y compuestos sobre producidos bajo condiciones de estrés oxidativo (Fierro et al., 2017). Se ha planteado la hipótesis de que si la producción de proteínas de estrés es costosa para los organismos, y la selección natural ha trabajado en la optimización de la relación coste/beneficio de las proteínas de estrés, la variación en la producción de estas proteínas se producirá en función de las condiciones ambientales (Coleman et al., 1995). La sobreexpresión durante la desecación, de enzimas como *Similar to ubiquitin specific protease 34, Ubiquitin-conjugating enzyme*, putative; las cuales son enzimas que activan las respuestas y participa en los mecanismos de tolerancia mediante la remoción de proteínas dañadas durante el estrés oxidativo (Contreras Porcia et al., 2013). La ubiquitin cumple también la función de reparación del ADN, regulación transcripcional y respuesta al estrés. (Glickman y Ciechanover, 2002).

5.4. Mecanismos de transportación

La enzima ABC *transporter-like*, está relacionada en la traslocación de una amplia variedad de compuestos a través de la membrana celular que incluyen iones, carbohidratos, lípidos y metales pesados (Ehrmann et al., 1998; Sipos y Kuchler, 2006; Contreras et al., 2010; Ritter et al., 2014). Se ha registrado la presencia de ABC *transporter-like* en el alga roja *Porphyra columbina*, sometida a desecación (Contreras-Porcía et al., 2013), nuestros resultados presentan la expresión reprimida de esta enzima durante la condición T2A (0 m). Enzimas como *Lactoylglutathione lyase, putative* (4.4.1.5.) fueron sobreexpresadas a 0 m, en condiciones de estrés esta enzima se sobreexpresa (López-Critoffanini et al., 2015) que incluyen la desecación (Hossain et al., 2009); además, interviene en la vía de degradación de *methylglyoxal* el cual puede sobreproducirse en condiciones de estrés por desecación y cumple la función de degradar proteínas e inactivar los sistemas de defensa antioxidante provocando la muerte celular (Martins, 2001; Fierro et al., 2016). De igual manera las acuaporinas, enzimas encargadas del sistema de transportación de iones y agua, en *M. pyrifera* se encontraron sobreexpresadas en la condición T2A (0 m) al igual que la enzima encargada de la actividad transmembrana Pc20g09640.

5.5. Mecanismos de defensa

Las poblaciones de algas pardas (*Phaeophyceae*) se ven afectadas por diversos patógenos, incluyendo hongos y oomicetos (Küpper y Müller 1999; Gachon et al., 2006; Sekimoto et al., 2008), plasmodiophorea (Maier et al., 2000), virus (Müller et al., 1998), bacterias (Sawabe et al., 1998; Sawabe, 2000), endófitos patógenos (Ellertsdóttir y Peters, 1997). Las defensas químicas de las *Phaeophyceae*s incluyen metabolitos secundarios tales como terpenoides y polifenoles (Hay y Fenical, 1988; Steinberg, 1992; Cronin y Hay, 1996; Hay, 1996; Pavia y Toth, 2000); el transcriptoma de *Macrocystis pyrifera* a 0 m, condición en que el alga está expuesta a muchos patógenos; reporta la activación de *Gibberellin 2-beta-dioxygenasa*, gen involucrado en la biosíntesis de dipertenoides. Muchos de los genes de defensa de plantas inducible están regulados por las vías de señalización que implican una molécula señal de peso molecular más bajo,

tal como el ácido jasmónico (JA), ácido salicílico, el etileno y posiblemente peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Las plantas sintetizan compuestos de toxicidad antimicrobiana directa (las especies reactivas de oxígeno (ROS), las fitoalexinas y activan los genes que participan en la cascada de oxilipinas tales como lipoxigenasas, en un proceso similar a la cascada del ácido araquidónico que participa en la activación de la respuesta inmune de los mamíferos. Nuestros resultados demuestran que existe una sobre expresión de genes, como la lipoxigenasa, que intervienen en la síntesis de ácidos grasos en condiciones en que los genes que actúan en la asimilación del nitrógeno se hallan sólo expresados en la condición de 10 m de profundidad. Según los reportes en *Nannochloropsis gaditana* (Simionato et al., 2013) y *Nannochloropsis oceánica* (Li et al., 2014; Xiao et al., 2013) en condiciones de cultivos de estas microalgas con agotamiento de nitrógeno se produce la sobrerregulación de genes que codifican ácidos grasos (por ejemplo: *Diacilglicerol aciltransferasa* PDAT).

En sus respuestas al estrés biótico y abiótico para proporcionar protección contra la infección y la toxicidad, las células están bajo el control de una gran cantidad de moléculas reguladoras. Los ácidos grasos poliinsaturado (AGPI) y sus derivados oxidados juegan un papel clave en la señalización implicada tanto en vegetales como animales en las respuestas al estrés (Farmer, 1994; Farmer et al., 1998). Similar a mamíferos, estrés biótico y abiótico, tales como la infección y exposición a xenobióticos en plantas inducen cascadas oxidativas de los ácidos grasos libres (AGL), que conducen a la síntesis de hormonas del estrés (Blechert et al., 1995; Howe y Schilmiller, 2002).

5.6. Aprataxina

Un hallazgo interesante fue la presencia de Aprataxina (APTX), proteína de la superfamilia del dominio de triada de la histidina implicada en la reparación del ADN frente a daños oxidativos (Moreira et al., 2001; Date et al., 2001; D'Errico et al., 2007) actualmente empleado a nivel médico como agente tumoral en el tratamiento del cáncer colono rectal en pacientes con baja capacidad de respuesta a los tratamientos clásicos de

quimioterapia (Dopeso et al., 2010); en nuestro estudio se detectó la inducción de un gen que codifica la Aprataxina en la condición T2A (0 m) dando a conocer las potencialidades de *M. pyrifera* para aplicaciones nutraceuticas.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que, interesantemente la mayoría de los genes que reportamos están involucrados en la función de metabolismo energético para el mantenimiento de *M. pyrifera* en condiciones de estrés y proporcionado la activación de respuesta para la protección, defensa y tolerancia a diferentes estresores ambientales.

Los análisis de la calidad de agua de mar, en la determinación de fosfatos reportan valores superiores al límite de cuantificación para ambos tratamientos T2A y T2B; Sin embargo, para T2B (10 metros) se detectó valores mayores aún, esto se explica porque el fosfato interviene en el metabolismo del carbono (fijación de carbono inorgánico) e interviene en las vías metabólicas para la fotorespiración (Cock et al., 2012) interviniendo enzimas como la *Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit)*.

En aguas frías se elevan los nitratos (Knotchick et al., 2012) por el contrario, cuando sube la temperatura del mar, los nutrientes disminuyen. Hay una fuerte relación lineal entre la concentración de los nitratos y la temperatura. Al sur de California, en la línea de costa, con temperaturas de 14.5 grados y aguas frías poseen más nitrato (Dayton et al., 1999; Konotchick et al., 2012). Nuestros resultados evidenciaron temperaturas superficiales del mar de 15°C y 16°C a 0 m y 10 m, respectivamente; lo que corrobora lo reportado. Los valores de nitratos detectados para ambos tratamientos T2A (0 metros) y T2B (10 metros) fueron elevados en comparación con los valores del límite de cuantificación. El nitrato es asimilado vía nitrato reductasa y nitrito reductasa NAD (P) H, la producción de NAD (P)H puede permitir a estos organismos reducir el nitrito en condiciones donde la ferridoxina (proteínas hierro-azufre) está limitada, como por ejemplo en condiciones de baja iluminación (Konotchick et al., 2012; Cock et al., 2012). Nuestros resultados indican la presencia de enzimas fijadoras de nitrógenos como la NAD(P)H-Nitrato reductasa que se encuentran expresados sólo a 10 m (T2B), los valores de nitritos son menores al límite de cuantificación en el tratamiento a 10 metros

y la presencia de enzimas como la Rieske (2Fe-2S) región se halla reprimida en esta condición.

Los análisis físicos químicos, reportaron mayor rendimiento del gel de alginato de sodio en el tratamiento T2B, esto concuerda con el perfil transcripcional de *M. pyrifera* en genes para la síntesis de alginatos. Los rendimientos en la extracción del alginato de sodio en caliente (80°C) obtenida en T2B coincide con otros rendimientos reportados en algas pardas como *Sargassum cymosum*, *Sargassum sp* y *M. pyrifera*, (Arvizú et al., 1996; Camacho & Hernández-Carmona, 2012) cuyos porcentajes se encuentran entre el 15.90% al 20.90%. Los valores de viscosidad promedio obtenidos en ambos tratamientos, T2A y T2B, están por debajo del 40% lo que indica que la calidad del ácido algínico es buena, valores superiores indican una mala conversión al ácido algínico y la viscosidad obtenida no es la real (Hernández-Carmona et al., 1999). Al comparar la viscosidad de una muestra comercial de alginato de sodio marca Sigma-Aldrich^R con el tratamiento T2B, los resultados del alginato de sodio del Perú tienen una calidad equivalente al 50% en relación al alginato comercial, a una concentración del 70%.

En los análisis de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de las muestras colectadas a 10 metros (T2B) se observó la presencia de polisacáridos en las paredes celulares, a manera de estructuras esponjosas, lo que concuerda con lo reportado por Andrade et al. (2004) que indican el rol que cumplen los polisacáridos de pared en las algas pardas, como barreras iónicas y de protección al acumular metales pesados. Los análisis de EDX, indican mayor porcentaje en la composición atómica y peso de elementos como carbono (C) en la pared celular, en relación al parénquima, en la condición T2B, lo que concuerda con Aquino et al. (2011) que indican que el aumento en la producción de polisacáridos carboxilados (por ejemplo, alginato de sodio) son una respuesta fisiológica a ambientes de alta salinidad, por el contrario la inhibición en la producción de polisacáridos sulfatados es una respuesta al estrés salino.

VI. CONCLUSIONES

1.- Se determinó el mapa transcriptómico *de novo* de *Macrocystis pyrifera* en condición intermareal y submareal, en donde el RNA seq evidenció la efectividad de esta tecnología y su utilidad, al detectar genes expresados diferencialmente en *M. pyrifera* bajo condiciones de superficie (0 m) y profundidad (10 m).

2.- Se investigó el transcriptoma global *de novo* de *M. pyrifera* bajo condiciones intermareales, mediante tecnología RNA seq (*Illumina NextSeq 500*) para comparar la respuesta diferencial de los genes que se expresan en condiciones de 0 m y 10 m de profundidad. Las vías de síntesis en la producción de genes para la fijación del carbono, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácidos grasos, producción de fitohormonas; así como la respuesta molecular de *M. pyrifera* en las condiciones de estrés a 0 m.

3.- Se identificó 167 genes expresados diferencialmente de los cuales 34 genes estaban relacionados al metabolismo primario de las algas, a la respuesta frente el estrés oxidativo y la síntesis de polisacáridos de pared.

4.- El mapa transcriptómico *de novo* de *M. pyrifera* evidenció una amplia respuesta adaptativa frente a cambios tan variables a su entorno natural. Consecuentemente, presentó una gran capacidad de tolerancia a los efectos del estrés abiótico y puede habitar en una extensa gama de ecosistemas marinos. La presencia de polisacáridos de pared, como alginatos, juega un rol importante en la regulación iónica para la adaptación de *Macrocystis* al estrés por efecto de la desecación y en la respuesta al estrés en general. Los análisis químicos proximales, histológicos y calidad del agua de mar concuerdan con los resultados obtenidos a nivel molecular y permitieron comparar información importante para comprender mejor la respuesta de *M. pyrifera* frente a condiciones de estrés.

5.- Se observó diferencias entre los mapas transcriptómicos *de novo* de *M. pyrifera*. En este sentido, la tolerancia al estrés por desecación, en la condición intermareal a 0 m (T2A), presentó una compleja respuesta metabólica, fisiológica e implicó la participación de un gran número de enzimas involucrada en diferentes vías encargadas de amortiguar y sobrellevar el efecto de la desecación en *M. pyrifera*. Se evidenció los mecanismos de respuesta al estrés abiótico como fue la síntesis de osmolitos compatibles para atenuar el efecto de otros tipos de estrés, como el estrés osmótico, mediante la producción de enzimas como *Urease accessory protein UreF*, así como también la síntesis de chaperonas o proteínas, activación de mecanismos de desintoxicación y activación del sistema de transportación de agua e iones. Durante en la condición submareal a 10 m (T2B), los genes que se expresaron predominantemente estaban involucrados en el metabolismo primario y energético, como por ejemplo la *Fructose-bisphosphate aldolase* que interviene en las vías metabólicas de la glicólisis y gluconeogénesis.

6.- Respecto a la síntesis de alginato, existe diferencias tanto en expresión de genes como en los análisis de microscopia, reología y rendimiento.

Este es el primer análisis transcriptómico *de novo* realizado en Perú para *M. pyrifera* y constituirá un recurso importante para estudios genómicos posteriores en algas pardas, sobre la identificación de genes funcionales implicados en diferentes procesos metabólicos.

VII. RECOMENDACIONES

Actualmente se han descritos cuatro especies de *Macrocystis* debido a su gran plasticidad morfológica pero sólo una está aceptada taxonómicamente, la más antigua, *Macrocystis pyrifera* (www.algaebase.org); esta plasticidad se evidencia por una organización tisular simple demostrada por ejemplo por la presencia de polisacáridos de pared a manera de estructuras esponjosas que cumplen la función de barreras iónicas y protección; es probable de que la plasticidad morfológica sea parte de la capacidad de tolerancia de *Macrocystis* frente a estresores. Mientras que muchas plantas terrestres intentan mantener condiciones controladas en respuesta al estrés, la estrategia de *Macrocystis* parece ser es la producción de compuestos orgánicos halogenados asociados con las defensas de las macroalgas contra los estresores bióticos y abióticos en respuesta al estrés por desecación. Está hipótesis plantea nuevas preguntas:

¿Qué características de la regulación de la expresión de genes permiten a *Macrocystis* permanecer funcional durante el estrés o al menos recuperar la funcionalidad después del estrés? ¿Qué mecanismos reguladores subyacen a los cambios transcriptómicos y morfológicos?

Comprender la base transcriptómica de la plasticidad de *Macrocystis* podría ayudar a comprender porque estos mecanismos no funcionan en organismos más complejos que las macroalgas.

Los resultados presentados constituyen el punto de partida para futuras investigaciones en macroalgas pardas; en especial otros estudios funcionales empleando herramientas como el

“silenciamiento” de genes (RNAi) y protocolos de transformación para proporcionar mutantes de un gen específico de interés y luego realizar estudios funcionales más detallados con los mutantes identificados.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABE, S.; KURASHIMA, A.; YOKOHAMA, Y.; TANAKA, J. 2001. The Cellular Ability of Desiccation Tolerance in Japanese Intertidal Seaweeds. *Botanica Marina*. 44: 125-131.
2. ABRAHAMSSON, K.; CHOO, K.S.; PEDERSÉN, M.; JOHANSSON, G.; SNOEIJIS, P. 2003. Effects of temperature on the production of hydrogen peroxide and volatile halocarbons by brackish-water algae. *Phytochemistry* 64:725–734.
3. ACLETO, C. 1986. Algas marinas del Perú de importancia económica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos UNMSM. Serie de divulgación. N^o 5. 107p.
4. ACOSTA, J. 1976. Estudio anatómico de tres especies de Phaeophyceae. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Museo de Historia Natural “Javier Prado”. Departamento de Botánica. Serie de Divulgación N0. 6. Lima. Perú.
5. ADEX (Asociación de Exportadores del Perú). 2008. Informe comercial de algas marinas. 15 p.
6. AGARDH, C.A. 1820. Species of algae have been duly noted, with synonymous specific differences and concise descriptions. Vol I. (1). 168 p.
7. AKAGAWA, H.; IKAWA, T.; NISIZAWA, K. 1972. The enzyme system for the entrance of $^{14}\text{CO}_2$ in the dark CO_2 -fixation of brown algae. *Plant Cell and Physiology*. 13: 999-1016.

8. ALTSCHUL, S.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215 (3): 403–410. DOI: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2). PMID 2231712.
9. ALVEAL, K. 1995. Manejo de algas marinas. En: Alveal, K., Ferrario, M., Oliveira, E. & Sar, E. (Eds.) *Manual de Métodos Ficológicos*. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción. 825-863 p.
10. ANDERS, S.; HUBER, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data *Genome Biology* 11R106, DOI: [10.1186/gb-2010-11-10-r106](https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106).
11. ANDRADE, L.R.; SALGADO, L.T.; FARINA, M.; PEREIRA, M.S.; MOURAO, P.A.S.; AMADO FILHO, G.M. 2004. Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *Journal of Structural Biology*. 145: 216–25.
12. AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists). 1990. 15th ed. Washington. 456-579.
13. AQUINO, R.S.; GRATIVOL, C.; MOURÃO, P.A.S. 2011. Rising from the Sea: Correlations between Sulfated Polysaccharides and Salinity in Plants. *PLoS ONE* 6(4):e18862. DOI:[10.1371/journal.pone.0018862](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018862).
14. ARNOLD, T. M.; TARGETT, N. M. 2003. To grow and defend: lack of tradeoffs for brown algal phlorotannins. *Oikos*. 100:406–8.
15. ARVIZU-HIGUERA, D.L.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y.E. 1995. Sistemas de carga y flujo continuo durante la etapa de preextracción ácida en el proceso de extracción de alginatos. *Ciencias Marinas*. 21: 25–37.
16. ARVIZU-HIGUERA, D.L.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y.E. 1996. Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción en

- el proceso de extracción de alginato de sodio a partir de *Macrocystis pyrifera*. Ciencias Marinas. 22: 511–521.
17. ASHBURNER, M.; BALL, C.A.; BLAKE, J.A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J.M.; DAVIS, A.P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S.S. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nature Genetic. 25: 25–29.
 18. ASTORGA, M. C.; HERNÁNDEZ, C.; VALENZUELA, J.; AVARIA-LLAUTUREO, J.; WESTERMEIER, R. 2012. Origin, diversification, and historical biogeography of the giant kelps genus *Macrocystis*: Evidence from Bayesian phylogenetic analysis. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 47: 573-579.
 19. BARRALES, H.; LOBBAN, C.S. 1975. The comparative ecology of *Macrocystis pyrifera* with emphasis in the forest of Chubut, Argentina. Journal of Ecology. 63: 657-677.
 20. BARROS, M.P.; PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; CARDOZO, K.M.H.; COLEPICOLO, P. 2005. Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae, Biol. Rhythm. Resource. 36: 67–82.

<http://dx.doi.org/10.1080/09291010400028666>
 21. BEARDALL, J.; RAVEN, J. 2012. Metabolism algal. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net>. Doi: [10.1002/9780470015902.a0000321.pub2](http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0000321.pub2).
 22. BECKLEY, L.E.; BRANCH, G.M. 1992. A quantitative scuba-diving survey of the sublittoral macrobenthos at subantarctic Marion Island. Polar Biology 11:553-563.

23. BERGLIN, M.; DELAGE, L.; POTIN, P.; VILTER, H.; ELWING, H. 2004. The enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules*. 5:2376–83.
24. BITTON, R.; BEN-YEHUDA, M.; DAVIDOVICH, M.; BALAZS, Y.; POTIN, P.; DELAGE, L.; COLIN, C.; BIANCO-PELED, H. 2006. Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives. *Macromolecular Bioscience*. 6:737–46.
25. BLECHERT, S.; BRODSCHELM, W.; HOLDER, S.; KAMMERER, L.; KUTCHAN, T.; MUELLER, M. 1995. The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 92: 4099-4105.
26. BOUARAB, K.; ADAS, F.; GAQUEREL, E.; KLOAREG, B.; SALAUN, J.P.; POTIN, P. 2004. The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiology*. 135:1838–1848.
27. BURRITT, D.J.; LARKINDALE, J.; HURD, K. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscular* following desiccation. *Planta*. 215: 829-838.
28. BUSCHMANN, A. H.; VÁSQUEZ, J. A.; OSORIO, P.; REYES, E.; FILÚN, L.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C.; VEGA, A. 2004. The effect of water movement, temperature and salinity on abundance and reproductive patterns of *Macrocystis spp.* (Phaeophyta) at different latitudes in Chile. *Marine Biology*. 145: 849-862.
29. CAMACHO, O; HERNÁNDEZ-CARMONA, G. 2012. Phenology and alginates of two *Sargassum* species from the Caribbean coast of Colombia. *Ciencias Marinas*. 38(2): 381-393.

30. CANDIA, A.; ROMO, H.; ALVEAL, K.; DALLAROSSA, V. 1979. Cultivo unialgal de *Macrocystis pyrifera* (L) C. Agardh de la Bahía de Concepción, Chile. *Rickia* 8: 75-83.
31. CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, B.M.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology Pharmacology*. 146: 60–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007>
32. CARON, L.; DOUADY, D.; DE MARTINO, A.; QUINET, M. 2001. Light harvesting in brown algae. *Cah Biology Marine*. 42:109-124.
33. CASTILLA, J.C. 1985. Food webs and functional aspects of the kelp *Macrocystis pyrifera*, community in the Beagle Channel, Chile. In *Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs*. Siegfried, W.R. (Eds.). Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 407-414 p.
34. CASTILLA, J.C.; MORENO, C.A. 1982. Sea urchins and *Macrocystis pyrifera*: Experimental test of their ecological relations in southern Chile. In *Proceedings of the International Echinoderm Conference*. Lawrence, J.M. (Eds.). Rotterdam: A.A. Balkema. 257-263 p.
35. CEH, J.; MOLIS, M.; DZEHA, T. M.; WAHL, M. 2005. Induction and reduction of anti-herbivory defenses in brown and red macroalgae of the Kenyan coast. *Journal Phycology*. 41:726–31.
36. CIECHANOVER, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. 1984. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 24: 27-53.
37. COCK, J.M.; STERCK, L.; ROUZE, P.; SCORNET, D.; ALLEN, A.E.; AMOUTZIAS, G.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; AURY, J.M.;

BADGER, J.H. 2010. The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. 465: 617–621.

<http://dx.doi.org/10.1038/nature09016>

38. COCK, J.M.; STERCK, L.; AHMED, S.; ALLEN, A.E.; AMOUTZIAS, G.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; ARUN, A.; AURY, J.M.; BADGER, J.H.; BESZTERI, B.; BILLIAU, K.; BONNET, E.; BOTHWELL, J.H.; BOWLER, CH.; BOYEN, C.; BROWNLEE, C.; CARRANO, C.J.; CHARRIER, B.; CHO, G.Y.; COELHO, S.M; COLLÉN, J.; LE CORGUILLÉ, G.; CORRE, E.; DARTEVELLE, L.; DA SILVA, C.; DELAGE, L.; DELAROQUE, N.; DITTAMI, S.; DOULBEAU, S.; ELIAS, M.; FARNHAM, G.; GACHON, C.M.; GODFROY, O.; GSCHLOESSL, B.; HEESCH, S.; JABBARI, J.; JUBIN, C.; KAWAI, H.; KIMURA, K.; KLOAREG, B.; KÜPPER, F.; LANG, D.; LE BAIL, A.; LUTHRINGER, R.; LEBLANC, C.; LEROUGE, P.; LOHR, M.; LOPEZ, P.; MACAISNE, N.; MARTENS, C.; MAUMUS, F.; MICHEL, G.; MIRANDA-SAAVEDRA, D.; MORALES, J.; MOREAU, H.; MOTOMURA, T.; NAGASATO, CH.; NAPOLI, C.; NELSON, D.; NYVALL-COLLÉN, P.; PETERS, A.; POMMIER, C.; POTIN, P.; POULAIN, J.; QUESNEVILLE, H.; READ, B.; RENSING, S.; RITTER, A.; ROUSVOAL, S.; MANOJ, S.; SAMSON, G.; SCHROEDER, D.; SCORNET, D.; SÉGURENS, B.; STRITTMATTER, M.; TONON, T.; TREGEAR, J.; VALENTIN, K.; VON DASSOW, P.; YAMAGISHI, T.; ROUZÉ, P.; VAN DE PEER, Y.; WINCKER, P. 2012. Chapter Five - The Ectocarpus Genome and Brown Algal Genomics: The *Ectocarpus* Genome Consortium, In: Gwenaél Piganeau, Editor(s), *Advances in Botanical Research*, Academic Press. 64:141-184.
- <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00005-0>.
39. COLEMAN, J.S.; HECKATHORN, S.A.; HALLBERG, R.L. 1995. Heat-shock proteins and thermos tolerance: linking molecular and ecological perspectives. *Trends in Ecology & Evolution*. 10: 305-306.

40. COLLÉN, J.; PEDERSEN, M. 1994. A stress-induced oxidative burst in *Eucheuma platycladum* (Rhodophyta). *Physiology Plant.* 92: 417 – 422.
41. COLLÉN, J.; GUIBLE-MARSOLLIER, I.; LEGER, J.J.; BOYEN, C. 2007. Response of the transcriptome of the intertidal red seaweed *Chondrus crispus* to controlled and natural stresses. *New Phytologist.* 176: 45–55.
42. CONDE, A.; SILVA, P.; AGASSE, A.; CONDE, C.; GERÓ, H. 2011. Mannitol transport and mannitol dehydrogenase activities are coordinated in *Olea europaea* under salt and osmotic stresses. *Plant & Cell Physiology.* 52: 1766–1775.
43. CONTRERAS, L.; MOENNE, A.; CORREA, J.A., 2005. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *Journal Phycology.* 41, 1184–1195.
44. CONTRERAS, L.; DENNETT, G.; MOENNE, A.; PALMA, R.E.; CORREA, J.A. 2007. Molecular and morphologically distinct *Scytosiphon* species (Scytosiphonales, Phaeophyceae) display similar antioxidant capacities. *Journal Phycology.* 43:1320-1328.
45. CONTRERAS, L.; MELLA, D.; MOENNE, A.; CORREA, J.A. 2009. Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology.* 94: 94–102.
46. CONTRERAS, L.; MOENNE, A.; GAILLARD, F.; POTIN, P.; CORREA, J.A. 2010. Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology.* 96: 85-89.

47. CONTRERAS-PORCIA, L.; THOMAS, D.; FLORES, V.; CORREA, J.A. 2011. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Exp. Bot.*, 62: 1815-1829.
48. CONTRERAS-PORCIA, L.; LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C.; LOVAZZANO, C.; FLORES-MOLINA, M.; THOMAS, D.; NÚÑEZ, A.; FIERRO, C.; GUAJARDO, E.; CORREA, J.; KUBE, M.; REINHARDT, R. 2013. Differential gene expression in *Pyropia columbina* (Bangiales, Rhodophyta) under natural hydration and desiccation conditions. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41(5): 933-958.
49. CONTRERAS-PORCIA, L.; MEYNARD, A.; LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C.; KUMAR, M. 2016. Tolerance pathways to desiccation stress in seaweeds. *System Biology of Marine Ecosystems*.
50. COLIN, C.; LEBLANC, C.; WAGNER, E.; DELAGE, L.; LEIZE-WAGNER, E.; VAN DORSSELAER, A.; KLOAREG, B.; POTIN, P. 2004. The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *Journal Biology Chemical*. 278: 23545-52.
51. CORNELISEN, C. D.; WING, S. R.; CLARK, K. L.; BOWMAN, M. H.; FREW, R. D.; HURD, C. L. 2007. Patterns in the d13C and d15N signature of *Ulva pertusa*: interaction between physical gradients and nutrient source pools. *Limnology Oceanography*. 52:820–32.
52. CORNWALL, E. C.H.; HEPBURN, D. C.H.; PRITCHARD, D.; CURRIE, K.I.; MCGRAW, C.H.M.; HUNTER, K, A.; HURD, C.L. 2012. Carbon-use strategies in macroalgae: differential responses to lowered pH and implications for ocean acidification. *Journal Phycology*. 48:138-144.
53. CRONIN, G.; HAY, M.E. 1996. Induction of seaweed chemical defenses by amphipod grazing. *Ecology*. 77: 2287-2301.

54. CRUZ-SUÁREZ, L.E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; GUAJARDO-BARBOSA, C. 2000 Uso de harina de Kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
55. CUI, X; CHURCHILL, G. A. 2003. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biology*. 4 (4):210. Doi:[10.1186/gb-2003-4-40210](https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-40210).[PMC 154570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/154570/). [PMID12702200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12702200/). [PMC 154570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/154570/).
56. CHANDRA, S.; HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S. 1996. Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiology*. 110: 979- 986.
57. CHARRIER, B.; COELHO, S.; LE BAIL, A.; TONON, T.; MICHEL, G.; POTIN, P.; KLOAREG, B.; BOYEN, C.; PETERS, A.F.; COCK, J.M. 2008. Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytologist*. 177: 319–332.
58. CHAPPLE, L.; SMERDONA, G.; BERRYB, R.; HAWKINSA, A. 1998. Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 229: 53 -68.
59. DAINES, B.; WANG, H.; WANG, L.; LI, Y.; HAN, Y.; EMMERT, D.; GELBART, W.; WANG, X.; LI, W.; GIBBS, R.; CHEN, R. 2011. The *Drosophila melanogaster* Transcriptome by Paired-End RNA Sequencing. *Genome Research*. 21: 315-324.
60. DATE, H.; ONODERA, O.; TANAKA, H. 2001. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Natural Genetics*. 29:184–8.

61. DAVIS, T. A.; RAMIREZ, M.; MUCCIL, A.; LARSEN, B. 2004. Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from *Sargassum spp.* *Journal Applied Phycology*. 16:275–84.
62. DAVISON, I.R.; PEARSON, G.A. 1996. Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Journal Phycology*. 32: 197-211.
63. DAYTON, P.K. 1985. The structure and regulation of some South American kelps communities. *Ecological Monograph*. 55: 447-468.
64. DEAN, T. A.; JACOBSEN, F.R. 1984. Growth of juvenile *Macrocystis pyrifera* (Laminariales) in relation to environmental factors. *Marine Biology*. 83: 301-11.
65. DE FRANCO, P; ROUSVOAL, S.; TONON, T.; BOYEN, C. 2008. Whole genome survey of the glutathione transferase family in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus*. *Marine Genomics*. 1: 135-148.
66. DEMES, K.W.; GRAHAM, M. H.; SUSKIEWICZ, T. S. 2009. Phenotypic plasticity reconciles incongruous molecular and morphological taxonomies: The giant kelp, *Macrocystis* (Laminariales, Phaeophyceae), is a monospecific genus. *Journal Phycology*. 45(6): 1266-1269.
67. DENG, Y.; YAO, J.; WANG, X.; GUO, H.; DUAN, D. 2012. Transcriptome sequencing and comparative analysis of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) under blue light induction. *PLoS ONE* 7: e39704.
68. D'ERRICO, M.; PARLANTI, E.; DOGLIOTTI, E. 2008. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutation Research*. 659: 4- 14.
69. DIECK, T.I. 1993. Temperature tolerance and survival in darkness of kelp gametophytes (Laminariales, Phaeophyta): Ecological and biogeographical implications. *Marine Ecology Progress Series* 100: 253-264.

70. DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. 2011. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science*. 182:29-41.
71. DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2008. *InfoStat*, versión 2008, Grupo *InfoStat*, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
72. DITTAMI, S.; SCORNET, D.; PETIT, J.; SÉGURENS, B.; DA SILVA, C.; DONDRUP, M.; GLATTING, K.; KONIG, R.; STERCK, L.; ROUZÉ, P.; VAN DE PEER, Y.; COCK, M.; BOYEN, C.; TONON, T. 2009. Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress. *Genome Biology*. 10: 1-20.
73. DITTAMI, S.M.; GRAVOT, A.; RENAULT, D.; GOULITQUER, S.; EGGERT, A.; BOUCHEREAU, A.; BOYEN, C.; TONON, T. 2011. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to abiotic stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant, Cell & Environment*. 34: 629–642.
74. DOHLER, G. 1996. Effect of UV irradiance on utilization of inorganic nitrogen by the Antarctic Diatom *Odontella weissflogii* (Janisch) Grunow. *Botanica Acta*. 109: 35–42.
75. DOPESO, H.; MATEO-LOZANO, S.; ELEZ, E.; LANDOLFI, S.; RAMOS, F.; HERNÁNDEZ-LOSA, J.; MAZZOLINI, R.; RODRIGUEZ, P.; BAZZOCCO, M.; CARRERAS, J.; ESPÍN, E.; ARMENGO, M.; WILSON, A.; MARIADASON, J.; RAMON, S.; TABERNERO, J.; SCHWARTZ, J.R.; ARANGO, D. 2010. Aprataxin Tumor Levels Predict Response of Colorectal Cancer Patients to Irinotecan-based Treatment. *Clinical Cancer Research*. 16: 2375-2382. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-09-3275](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3275).

76. DOUBNEROVÁ, V.; RYSLAVÁ, H. 2011. What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? *Plant Science*. 180:575–583.
77. DRAGET, K. I.; SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. 2005. Alginates from algae. In: *Polysaccharides and Polyamides in the food industry. Properties, production, and patents*. Edited: A. Steinbuchel and S.K. Rhee. 1-30 p.
78. DRING, M. J.; V. MAKAROV, E.; SCHOSCHINA, M.; LORENZ, M.; LUNING, K. 1996. Influence of ultraviolet-radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life-history stages of three species of *Laminaria* (Phaeophyta). *Marine Biology* 126: 183–191.
79. DRUEHL, L. 2000. *Pacific Seaweeds, A guide to common seaweeds of the west coast*. The Canada Council For the Arts Since, Canada. 93 p.
80. DUARTE, P.; FERREIRA, J.G. 1995. Seasonal adaptation and short-term metabolic responses of *Gelidium sesquipedale* to varying light and temperature. *Marine Ecology Progress Series*. 121:289–300.
81. EDGAR, G. J.; BARRETT, N. S.; MORTON, A. J.; SAMSON, C. R. 2004. Effects of algal canopy clearance on plant, fish and macroinvertebrate communities on eastern Tasmanian reefs. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*. 312:67–87.
82. EDYVANE, K. 2003. *Conservation, Monitoring and Recovery of Threatened Giant Kelp (*Macrocystis pyrifera*) Beds in Tasmania – Final Report*.
83. EDWARDS, M. S.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G. 2005. Delayed recovery of giant kelp near its southern range limit in the North Pacific following El Niño. *Marine Biology*. 147: 273-279.
84. EGAN, A.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D. 2012. Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. *American Journal of Botany*. 99 (2): 175-185.

85. EHRMANN, M.; EHRLE, R.; HOFMANN, E.; BOOS, W.; SCHLÖSSER, A. 1998. The ABC maltose transporter. *Molecular Microbiology*. 29: 685-694.
86. EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(25): 14863–14868.
87. ELLERTSDÓTTIR, E. AND PETERS, A.F. 1997. High prevalence of infection by endophytic brown algae in populations of *Laminaria spp.* (Phaeophyceae). *Marine Ecology Progress Series*. 146: 135-143.
88. ENGELKEN, J.; BRINKMANN, H.; ADAMSKA, I. 2010. Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evolutive Biology*. 10:233.
89. ENSMINGER, I.; HAGEN, C.; BRAUNE, W. 2000. Strategies providing success in variable habitat: II. Ecophysiology of photosynthesis of *Cladophora glomerata*. *Plant, Cell and Environment*. 23:1129–1136.
90. ENSMINGER, I.; XYLANDER, M.; HAGEN, C.; BRAUNE, W. 2001. Strategies providing success in variable habitat: III. Dynamic control of photosynthesis in *Cladophora glomerata*. *Plant, Cell and Environmental*. 24:769–779.
91. ESAU, K. 1969. The phloem. In Linsbauer, K. (Ed.) *Handbuch der Pflanzenanatomie*. 5 (2): 263-271. Ed. Gebruder Borntraeger. Berlin.
92. ESTES, J. A.; DANNER, E. M.; DOAK, D. F.; KONAR, B.; SPRINGER, A. M.; STEINBERG, P. D.; TINKER, M. T.; WILLIAMS, T. M. 2004. Complex trophic interactions in kelp forest ecosystems. *Bull. Marine Sciences*. 74:621–38.
93. FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J.A. 2007. *Aquatic Photosynthesis*. 2nd edn. Princeton, NJ: Princeton University Press.

94. FARMER, E.E. 1994. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Molecular Biology*. 26: 1423-1437.
95. FARMER, E.E.; WEBER, H.; VOLLENWEIDER, S. 1998. Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. *Planta*. 206: 167-174.
96. FARMER, E.E. 1994. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Molecular Biology*. 26: 1423 – 1437.
97. FARMER , E.E. ,WEBER , H. VOLLENWEIDER , S. 1998. Fatty acid signaling in *Arabidopsis* . *Planta* 206: 167 – 174.
98. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) 2011. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Plan de trabajo sobre el cambio climático y los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. 14^o Reunión Ordinaria. FAO-CGRFA-13/11/2011.
99. FEDER, J.H., ROSSI, J.M., SOLOMON, J., SOLOMON, N., LINDQUIST, S., 1992. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Development*. 6: 1402–1413
100. FIERRO, C.; LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C.; LATORRE, N.; RIVAS, J.; CONTRERAS-PORCIA, L. 2016. Methylglyoxal metabolism in Seaweeds during Desiccation *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 51(1): 187-191. DOI [10.4067/S0718-19572016000100019](https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000100019).
101. FIERRO, C.; LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C.; MEYNARD, A.; LOVAZZANO, C.; CASTAÑEDA, F.; GUAJARDO, E.; CONTRERAS-PORCIA, L. 2017. Expression profile of desiccation tolerance factors in intertidal seaweed species during the tidal cycle. *Planta*. DOI [10.1007/s00425-017-2673-0](https://doi.org/10.1007/s00425-017-2673-0).

102. FIGUEROA, F. L.; C. JIMÉNEZ, B.; VIÑEGLA, E.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILERA, A.; FLORES-MOYA, M.; ALTAMIRANO, M.; LEBERT, D.; HADER, P. 2002. Effects of solar UV radiation on photosynthesis of the marine angiosperm *Posidonia oceanica* from southern Spain. *Marine Ecology Progress Series*. 230: 59–70.
103. FIGUEROA, F.L.C.; JIMÉNEZ, B.; VIÑEGLA, E.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILERA, A.; FLORES-MOYA, M.; ALTAMIRANO, M.; LEBERT, D.; HADER, P. 2002. Effects of solar UV radiation on photosynthesis of the marine angiosperm *Posidonia oceanica* from southern Spain. *Marine Ecology Progress Series*. 230: 59–70.
104. FOWLER-WALKER, M. J.; CONNELL, S. D.; GILLANDERS, B. M. 2005. To what extent do geographic and associated environmental variables correlate with kelp morphology across temperature Australia? *Marine and Fresh Water Research*. 56: 877-887.
105. FOYER, Ch. H.; PARRY, M.; NOCTOR, G. 2003. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany*. 54: 585-593.
106. FOYER, Ch. H.; NOCTOR, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal*. 11: 861–905
107. FOYER, Ch. H.; Shigueru, S. 2011. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiology*. 155: 93-100.
108. FLEMING, A.E. 1998. Growth, intake, feed conversion efficiency and chemosensory preference of the Australian abalone, *Haliotis rubra*. *Aquaculture* 132 (3-4): 297-311.
109. FLORES-MOLINA, M.R.; THOMAS, D.; LOVAZZANO, C.; NÚÑEZ, A.; ZAPATA, J.; KUMAR, M.; CORREA, J.A.; CONTRERAS-PORCIA, L. 2014.

- Desiccation stress in intertidal seaweeds: effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany* 113: 90–99.
110. FUJIKI, K.; MATSUYAMA, H.; YANO, T. 1994. Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*. 17(4): 349-355.
111. GACHON, C.M.M.; KÜPPER, H.; KÜPPER, F.C.; ŠETLÍK, I. 2006. Witnessing effects of a pathogen on photosynthesis of its host at the cellular level: chlorophyll fluorescence kinetic microscopy of *Pylaiella littoralis* (Phaeophyceae) infected by *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota). *European Journal of Phycology*. 41: 395-403.
112. GAN, Q.; CHEPELEV, I.; WEI, G.; TARAYRAH, L.; CUI, K.; ZHAO, K.; CHEN, X. 2010. Dynamic Regulation of Alternative Splicing and Chromatin Structure in *Drosophila* Gonads Revealed by RNA-seq. *Cell Research*. 20: 763-783.
113. GANZON-FORTES, E.T. 1997. Influence of tidal location on morphology, photosynthesis and pigments of the agarophyte, *Gelidiella acerosa*, from Northern Philippines. *Journal Applied Phycology*. 9:525–532.
114. GAQUEREL, E.; HERVÉ, C.; LABRIÈRE, C.; BOYEN, C.; POTIN, P.; SALAÜN, J.P. 2007. Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyl jasmonate. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1771: 565-575
115. GARBER, M.; GRABHERR, M.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. 2011. Computational Methods for Transcriptoma Annotation and Quantification Using RNAseq. *Nature Methods*. 8: 469-478.
116. GERARD, V.A. 1976. Some aspects of material dynamics and energy flow in a kelp forest in Monterey Bay, California. Ph.D. dissertation, University of California Santa Cruz, Santa Cruz, California.

117. GERWICK, W.H. 1994. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1211: 243-255.
118. GÉVAERT, F.; CRÉACH, A.; DAVULT, D.; MIGNÉ, A.; LEVAVASSEUR, G.; PARZEL, P.; HOLL, A.C.; LEMOINE, Y. 2003. *Laminaria saccharina* photosynthesis measured in situ: photoinhibition and xanthophylls cycle during a tidal cycle. *Marine Ecology Progress Series*. 247:43– 50
119. GLENN, T. C. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*. 11: 759-769.
120. GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. 2002. The ubiquitin proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Review*. 82:373-428.
121. GONZALEZ-AVILES, J.G.; SHEPHERD, S.A. 1996. Growth and survival of the blue abalone *Haliotis fulgens* in barrels at Cedros Island, Baja California, with a review of abalone barrel culture. *Aquaculture*. 140(1-2): 169-176.
122. GRABHERR, M.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. 2011. Computational Methods for Transcriptoma Annotation and Quantification Using RNAseq. *Nature Methods*. 8: 469-478.
123. GRAHAM, M. H. 2004. Effects of local deforestation on the diversity and structure of Southern California giant kelp forest foods webs. *Journal Ecosystems* 7: 341-357.
124. GRAHAM, M.H.; VÁSQUEZ, J.A.; BUSCHMANN, A. 2007. Global ecology of the giant kelp *Macrocystis*: From ecotypes to ecosystems. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 39 – 88 p.

125. GREEN, B.R.; KÜHLBRANDT, W. 1995. Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynthesis Research*. 44:139-148.
126. GROISILLIER, A.; SHAO, Z.; MICHEL, G.; GOULITQUER, S.; BONIN, P.; KRAHULEC, S.; NIDETZKY, B.; DUAN, D.; BOYEN, C.; TONON, T. 2014. Mannitol metabolism in brown algae involves a new phosphatase family, *Journal Experimental Botany*. 65: 559–570 <http://jxb.oxfordjournals.org/content/65/2/559>.
127. GROSSMAN A, MANODORI A, SNYDER D. 1990. Light-harvesting proteins of diatoms: their relationship to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants and their mode of transport into plastids. *Molecular Gen Genetic*. 224:91-100.
128. GUILLEMIN, M.L.; VALERO M.; TELLIER, F.; MACAYA, E.C.; DESTOMBE, C.; FAUGERON, S. 2016. Phylogeography of Seaweeds in the South East Pacific: Complex Evolutionary Processes Along a Latitudinal Gradient. In: Hu ZM., Fraser C. (eds) *Seaweed Phylogeography*. Springer, Dordrecht. Doi: https://doi.org/10.1007/978-94-017-7534-2_10.
129. GULLEDGE, A.; ROBERTS, A.; VORA, H.; PATEL, K.; LORAIN, A. 2012. Mining *Arabidopsis thaliana* RNA-Seq Data with Integrated Genome Browser Reveals Stress-Induced Alternative Splicing of the Putative Splicing Regulator SR45A. *American Journal of Botany*. 99 (2): 219- 231.
130. GUZMÁN DEL PROO, S.A.; CASAS-VALDEZ, M.; DÍAZ-CARRILLO, A.; DÍAZ-LÓPEZ, M.L.; PINEDA-BARRERA, J.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.E. 1986. Diagnóstico sobre las investigaciones y explotación de las algas marinas en México. *Investigaciones Marinas Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas CICIMAR*. 3(2): 1-63.
131. HAAS, B.J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P.D.; BOWDEN, J.; COUGER, M.B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER,

- M.; MACMANES, M.D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHET, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C.; HENSCHER, R.; LEDUC, R. D.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. 2013. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*. 8(8): 1494- 1512.
132. HADER, D.; PORST, M.; LEBERT, M. 2001. Photosynthetic performance of the Atlantic brown macroalgae, *Cystoseira abiesmarina*, *Dictyota dichotoma* and *Sargassum vulgare*, measured in Gran Canaria on site. *Environment Experimental Botany*. 45:21–32
133. HALL, T. A. 1999. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
134. HANELT, D.; HUPPERT, K.; NULTSCH, W. 1992. Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in red algae. *Botany Acta*. 105:278–284.
135. HANELT, D.; HUPPERT, K.; NULTSCH, W. 1993. Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Marine Ecology Progress Series*. 97:31–37.
136. HARTL, F.-U.1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381: 571–580.
137. HARROLD, C.; LIGHT, K.; LISIN, S. 1998. Organic enrichment of submarine-canyon and continental shelf benthic communities by macroalgal drift imported from nearshore kelp forests. *Limnology and Oceanography*. 43: 669-678.
138. HAUENSTEIN, E.; GONZÁLEZ, M. 1994. *Biología de las algas y plantas acuáticas. Manual de actividades prácticas*. Universidad Católica de Temuco. Chile.

139. HAY, M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 200: 103-134.
140. HAY, M.E.; FENICAL, W. 1988. Marine plant–herbivore interactions: The ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 19: 111-145.
141. HENKEL, S. K.; HOFMANN, G. E. 2008. Differing patterns of HSP70 gene expression in invasive and native kelp species: Evidence for acclimation-induced variation. *Journal Applied Phycology*. 20: 915-924.
142. HEPBURN, C. D.; PRITCHARD, D. W.; CORNWALL, C. E.; MCLEOD, R. J.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A.; HURD, C. L. 2011. Diversity of carbon use strategies in a kelp forest community: implications for a high CO₂ ocean. *Global Change Biology*. 17: 2488–97.
143. HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; MCHUGH, D.J.; ARVIZU-HIGUERA, D.L.; RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y. E. 1999. Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. Part 1. The effect of pre-extraction treatments on the yield and quality of alginate. *Journal Applied Phycology*. 10: 507–513.
144. HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; HUGHES, B.; GRAHAM, M.H. 2006. Reproductive longevity of drifting kelp *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) in Monterey Bay, USA. *Journal of Phycology*. 42: 1199-1207.
145. HOFMANN, G.E.; SOMERO, G.N. 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *Journal Experimental Biology*. 198: 1509–1518
146. HOFFMANN, A. J.; SANTELICES, B. 1997. *Flora Marina de Chile Central*. Ediciones Pontificias Universidad Católica de Chile. Santiago.434 p.

147. HOSSAIN, M.A.; HOSSAIN, M.Z.; FUJITA, M. 2009. Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian Journal of Crop Science*. 3:53–64.
148. HOWE, G.A.; SCHILMILLER, A.L. 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 230-236.
149. HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. 4:44-57.
150. HUEY, R.B.; BENNETT, A.F. 1990. Physiological adjustments to fluctuating thermal environments: an ecological and evolutionary perspective. In: Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (Eds.), *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 37–61.
151. IGARASHI, D.; TSUCHIDA, H.; MIYAO, M.; OHSUMI, C. 2006. Glutamate: Glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. *Plant Physiology*. 142: 901-910.
152. IMARPE (Instituto del Mar del Perú). 2010. Caracterización bio-oceanográfica del Área Marino Costera entre Punta San Juan y Playa Yanyarina. Perú. 55 p.
153. IMARPE (Instituto del Mar del Perú) 2012. Estudios sobre Macroalgas Pardas en el Sur del Perú. 2011 – 2015. Informe IMARPE ISSN 0378-7702. Setiembre. Callao. Perú.
154. INGLIS, G. 1989. The colonization and degradation of stranded *Macrocystis pyrifera* (L.C. Aghard) by the macrofauna of a New Zealand sandy beach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 125: 203-218.
155. IRELAND, H.E.; HARDING, S.J.; BONWICK, G.A.; JONES, M.; SMITH, C.J.; WILLIAMS, J. H. 2004. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of

- environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers*. 9: 139-155.
156. JACKSON, G.A. 1977. Nutrients and production of giant kelp, *Macrocystis pyrifera* southern California. *Limnology and Oceanography*. 22: 979-995.
157. JAHAN, A.; AHMAD, I.Z.; FATIMA, N.; ANSARI, V.A.; AKHTAR, J. 2017. Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: a review. *Phycologia*. 56: 410–422. <https://doi.org/10.2216/15.58.1>
158. JAMERS, A.; BLUST, R.; DE COEN, W. 2009. Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquatic Toxicology*. 92: 114-121.
159. JI, Y., TANAKA, J. 2002. Effect of desiccation on the photosynthesis of seaweeds from the intertidal zone in Honshu, Japan. *Phycological Research*. 50: 145–153.
160. JIN, W.; RILEY, R.M.; WOLFINGER, R.D.; WHITE, K.P.; PASSADOR-GURGEL, G.; GIBSON, G. 2001. The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*. 29: 389–395.
161. JONES, D.P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 8: 1865–1879.
162. KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. 2011. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*. 98(2): 137-144.
163. KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. 2014. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *DNA Cloning*

and Assembly Methods. Methods in Molecular Biology. Svein Valla and Rahmi Lale (ed.), Humana Press. 1116: 271-302.

164. KARENTZ, D. 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. In Weiler, C. S. & P. A. Penhale (eds.) Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects. Antarctic Research Series. American Geophysical Union, Washington DC: 93–110.
165. KERN, G.; SCHMIDT, M.; BUCHER, J.; JAENICKE, R. 1992. Glycosylation inhibits the interaction of invertase with the chaperone GroEL. FEBS Lett. 305: 203–205.
166. KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. 1988. Structure of the cell-walls of marine-algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. Oceanography and Marine Biology. 26: 259-315.
167. KONOTCHICK, T.; DUPONT, CH.; VALAS, R.; BADGER, J.; ALLEN, A. 2012. Transcriptomic analysis of metabolic function in the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, across depth and season. New Phytologist. 198: 398-407.
168. KREBS, R.A.; LOESCHCKE, V. 1994. Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. Functional Ecology. 8: 730–737.
169. KUMAR, A.R.P.; SINHA, D.; HADER, P. 1996. Effect of UV-B on enzymes of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. Journal of Plant Physiology. 148: 86–91.
170. KUMAR, M.; KUMARI, P.; GUPTA, V.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. 2010. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress. Journal of Experimental Marine Biology Ecology. 391: 27–34.

171. KUMAR, M.; GUPTA, V.; TRIVEDI, N.; KUMARI, P.; BIJO, A. J.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. 2011. Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Environmental and Experimental Botany*. 72: 194–201.
172. KUNDEL, M.; THORENZ, U. R.; PETERSEN, J. H.; HUANG, R. J.; BINGS, N. H.; HOFFMANN, T. 2012. Application of mass spectrometric techniques for the trace analysis of short-lived iodine-containing volatiles emitted by seaweed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402: 3345–3357.
173. KÜPPER, F.C.; MÜLLER, D.G. 1999. Massive occurrence of the heterokont and fungal parasites *Anisolpidium*, *Eurychasma* and *Chytridium* in *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Nova Hedwigia*. 69: 381-389.
174. KÜPPER, F.C.; KLOAREG, B.; GUERN, J.; POTIN, P. 2001. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiology*. 125: 278-291.
175. KÜPPER, F.C.; MÜLLER, D.G.; PETERS, A.F.; KLOAREG, B.; POTIN, P. 2002. Oligoalginat recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of the sporophytes of Laminariales. *Journal Chemical Ecology*. 28 : 2057-2081.
176. KÜPPER, F.C.; GAQUEREL, E.; BONEBERG, E.M.; MORATH, S.; SALAÜN, J.P.; POTIN, P. 2006. Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades. *Journal of Experimental Botany*. 57:1991-1999.
177. KÜPPER, F. C.; CARPENTER, L. J.; MCFIGGANS, G. B.; PALMER, C. J.; WAITE T. J.; BONEBERG, E. M.; WOITSCH, S.; WEILLER, M.; ABELA, R.; GROLIMUND, D.; POTIN, P.; BUTLER, A.; LUTHER, G.W.; KRONECK, P.M.H.; MEYER-KLAUCKE, W.; FEITERS, M. C. 2008: Iodide accumulation

provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceeding Natural Academy Science USA*. 105:6954-6958.

178. KÜPPER, F.C.; GAQUEREL, E.; COSSE, A.; ADAS, F.; PETERS, A.F.; MÜLLER, D.G ; KLOAREG, B.; SALAÜN, J-P.; POTIN, P. 2009. Free Fatty Acids and Methyl Jasmonate Trigger Defense Reactions in *Laminaria digitata*. *Plant Cell Physiology*. 50(4): 789-800.
179. LADAH, L.B.; ZERTUCHE, J.A.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G. 1999. Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Phaeophyceae) recruitment near its southern limit in Baja California after mass disappearance during ENSO 1997 – 1998. *Phycology* 35: 1106-1112.
180. LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 9: 357–359. DOI: [10.1038/nmeth.1923](https://doi.org/10.1038/nmeth.1923).
181. LATURNUS, F.; SVENSSON, T.; WIENCKE, C.; ÖBERG, G. 2004. Ultraviolet radiation affects emission of ozone-depleting substances by marine macroalgae: results from a laboratory incubation study. *Environmental Science Technology*. 38: 6605-6609.
182. LAWRENCE J.M., OLAVE, S., OTAIZA, R., LAWRENCE, A. L., BUSTOS, E., 1997. Enhancement of gonad production in the sea urchin *Loxechinus albus* in Chile fed extruded feeds. *Journal of the World Aquaculture Society*. 28(1): 91-96.
183. LE BARRE, S.; POTIN, P.; LEBLANC, C.; DELAGE, L. 2010. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs*. 8: 988-1010.
184. LEBLANC, C.; COLIN, C.; COSSE, A.; DELAGE, L.; LA BARRE, S. L.; MORIN, P.; FIÉVET, B.; VOISEUX, C.; AMBROISE, Y.; VERHAEGHE, E.; AMOUROUX, D.; DONARD, O.; TESSIER, E.; POTIN, P. 2006. Iodine

- transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimistry*. 88:1773–1785.
185. LLELLISH, J.; FERNÁNDEZ, E.; HOOKER, Y. 2001. Disturbancia del bosque submareal de *Macrocystis pyrifera* durante El Niño 1997-1998 en la Bahía de Pucusana. En: Alveal, K., Antezana, T. (Eds.). *Sustentabilidad de la biodiversidad. Un problema actual: bases científico técnicas, teorizaciones y proyecciones*. 331-350 p. Ediciones Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
186. LEVRING, T. 1960. Contributions to the marine algal flora of Chile. Reports of the Lund University Chile Expedition. 1948-1949 p.
187. LEWIS, M.J.; PELHAM, H.R.B. 1985. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kD heat shock protein. *European Molecular Biology Organization Journal*. 4: 3137-3143.
188. LI, G.C.; WERB, Z. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proceedings of the Natural. Academy Sciences. USA*. 79: 3218–3222.
189. LI, J., HAN, D., WANG, D. 2014. Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae, *Plant Cell*. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.1113.121418>.
190. LI, W. 2012. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. 10(6): 1231003. DOI: 10.1142/S0219720012310038.
191. LI, W.; FREUDENBERG, J.; SUH, Y. J.; YANG, Y. 2014. *Using volcano plots and regularized-chi statistics in genetic association studies*. *Computational Biology and Chemistry*. 48: 77–83. DOI: [10.1016/j.compbiolchem.2013.02.003](https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2013.02.003)

192. LISTER, R.; GREGORY, B.; ECKER, J. 2009. Next Is Now: New Technologies for Sequencing of Genomes, Transcriptomes and Beyond. *Current Opinion in Plant Biology*. 12 (2): 107-118.
193. LIU, F.; SUN, X.; WANG, W.; LIANG, Z. 2014. De novo transcriptome analysis-gained insights into physiological and metabolic characteristics of *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal Applied Phycology*. 26:1519 – 1526. DOI [10.1007/s10811-013-0140-2](https://doi.org/10.1007/s10811-013-0140-2).
194. LOBBAN, CH. S.; HARRISON, P.J. 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge. Cambridge University Press. 366 pp.
195. LOCKHART, D.; WINZELER, E. 2000. Genomics, Gene Expression and DNA Arrays. *Nature*. 415: 827-836.
196. LONGSTAFF, B.; KILDEA, T.; RUNCIE, J. W.; CHESHIRE, A.; DENNISON, W.C.; HURD, C.; KANNA, T.; RAVEN, J.; LARKUM, A.W.D. 2002. A study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynthesis Research*. 74:281–293
197. LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C.; TELLIER, F.; OTAÍZA, R.; CORREA, J.A.; CONTRERAS-PORCIA, L. 2013 Tolerance to air exposure: a feature driving the latitudinal distribution of two sibling kelp species. *Botanica Marina*. 56:431-440.
198. LÓPEZ-CRISTOFFANINI, C.; ZAPATA, J.; GAILLARD, F.; POTIN, P.; CORREA, J. A.; CONTRERAS-PORCIA, L. 2015. Identification of proteins involved in desiccation tolerance in the red seaweed *Pyropia orbicularis* (Rhodophyta, Bangiales). *Proteomics*. 15:3954-3968.
199. LOSH, J. L.; YOUNG, J.I.; MOREL, F.M.M. 2013. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton. *New Phytology*. 198:52–58.

200. LU, G.; FAN, D.; ZHU, C.; LI, W.; ZHAO, Q. 2010. Function Annotation of the Rice Transcriptoma at Single-Nucleotide Resolution by RNA-Seq. *Genome Research*. 20: 1238-49.
201. LUO, R.X.; DEAN, D.C. 1999. Chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Journal of the National Cancer Institute*. 91: 1288-1294.
202. MACAYA, E.; BOLTAÑA, S.; HINOJOSA, I.; MACCHIAVELLO, J.; VALDIVIA, N.; VÁSQUEZ, N. 2005. Presence of porophylls. In floating kelp rafts of *Macrocystis spp.* (Phaeophyceae) along the Chilean Pacific Coast. *Journal of Phycology*. 41: 913-922.
203. MACAYA, E.; ZUCCARELLO, G. C. 2010. Genetic structure of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* along the southeastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series MEPS*. 420: 103-112.
204. MAHER, C.; KUMAR-SINHA, C.; CAO, X.; KALYANA-SUNDARAM, S.; HAN, B.; JING, X.; SAM, L.; BARRETTE, T.; PALANISAMY, N.; CHINNAIYAN, A. 2009. Transcriptome Sequencing to Detect Gene Fusions in Cancer. *Nature*. 458: 97-101.
205. MAGNUSSON, G. 1997. Diurnal measurements of *Fv/Fm* used to improve productivity estimates in macroalgae. *Marine Biology*. 130:203–208.
206. MAIER, I. 1995. Brown algal pheromones. In *Progress in Phycological Research*. Edited by Round, F.E. and Chapman, D.J. pp. 51 – 102. Biopress Ltd., Bristol, UK.
207. MAIER, I.; PARODI, E.; WESTERMEIER, R.; MÜLLER, D.G. 2000. *Maullinia ectocarpii* gen. et sp. nov. (Plasmodiophorea), an intracellular parasite in *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) and other filamentous brown algae. *Protist*. 151: 225-238.

208. MANN, K. 1973. Seaweeds: their productivity and strategy for growth. *Science* 182: 975-981.
209. MARSDEN, I. D.; WILLIAMS, P. M.J. 1996. Factors affecting the grazing rate of the New Zealand abalone *Haliotis iris* (Martyn). *Journal of Shellfish Research* 15(2): 401-406.
210. MARTINS, A.M.; CORDEIRO, C.A.; PONCES, A.; FREIRE, M. 2001. In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 499:41–44.
211. MARTINS, M. J.; MOTA, C.F.; PEARSON, G.A. 2013. Sex – based gene expression in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *BMC Genomics*. 14: 294-306.
212. McHUGH, D.J. 2003. *A Guide to the Seaweed Industry*. FAO, Rome.
213. MICHEL, G.; TONON, T.; SCORNET, D.; COCK, J. M.; KLOAREG, B. 2010. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist*. 188: 82-97.
214. MIRALTO, A.; BARONE, G.; ROMANO, G.; POULET, S.A.; IANORA, A.; RUSSO, G.L. 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*. 402: 173-176.
215. MITTLER, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7:405-410.
216. MOEN, E.; LARSEN, B.; ØSTGAARD, K. 1997. Aerobic microbial degradation of alginate in *Laminaria hyperborea* stipes containing different levels of polyphenols. *Journal Applied Phycology*. 9:45–54

217. MOORE, B.S. 1999. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Natural Product Report*. 16: 653 – 674.
218. MOREIRA, M.C.; BARBOT, C.; TACHI, N. 2001. The gene mutated in ataxiaocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nature Genetics*. 29:189-93.
219. MORIYA, Y.; ITOH, M.; OKUDA, S.; YOSHIZAWA, A.; KANEHISA, M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research*. 35, W182-W185.
220. MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. 2008. Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*. 5: 621-628.
221. MTOLERA, M; COLLÉN, J.; PEDERSÉN, M.; EKDAHL, A.; ABRAHAMSSON, K.; SEMESI, A. 1996. Stress induced production of volatile halogenated organic compounds in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensity. *European Journal Phycology*. 31:89-95.
222. MÜLLER, D.G.; JAENICKE, L.; DONIKE, M.; AKINTOBI, T. 1971. Sex attractant in a brown alga: Chemical structure. *Science*. 171: 815 - 817.
223. MÜLLER, D.G.; KAPP, M.; KNIPPERS, R. 1998. Viruses in marine brown algae. *Advances in Virus Research*. 50: 49-67.
224. MUTASA-GOTTGENS, E.; JOSHI, A.; HOLMES, H.; HEDDEN, P.; GOTTGENS, B. 2012. A New RNASeq-Based Reference Transcriptome for Sugar Beet and Its Application in Transcriptome-Scale Analysis of Vernalization and Gibberellin Responses. *BMC Genomics*. 13: 99

225. NAGALAKSHMI, U.; WANG, Z.; WAERN, K.; SHOU, CH.; RAHA, D.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. 2008. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science*. 320: 1344-1349.
226. NORTH, W.J.; JACKSON, G. A.; MANLEY S. L. 1986. *Macrocystis* and its environment: known and unknown. *Aquatic Botany*. 26: 9-26.
227. NYVALL, P.; CORRE, E.; BOISSET, C.; BARBEYRON, T.; ROUSVOAL, S.; SCORNET, D.; KLOAREG, B.; BOYEN, C. 2003. Characterization of Mannuronan C-5-Epimerase Genes from the Brown Alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiology*. 133: 726-735.
228. OROZCO-CÁRDENAS, M.L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13: 179 -191
229. PALACIOS, M.; MANSILLA, A. 2003. Desarrollo de gametofitos y esporofitos de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (Laminariales: Lessoniaceae) de la Región de Magallanes en condiciones de laboratorio. *Anales del Instituto de la Patagonia Ex Serie Ciencias Naturales*. 31: 43-63.
230. PALMER, C.J.; ANDERS, T.L.; CARPENTER, L. J.; KÜPPER, F.C.; MCFIGGANS, G. 2005. Iodine and halocarbon response of *Laminaria digitata* to oxidative stress and links to atmospheric new particle production. *Environmental Chemical*. 2: 282-290.
231. PARKER, B. C.; HUBER, J. 1965. Translocation in *Macrocystis* II. Fine structures of the sieve tubes. *Journal Phycology* I. 172-179.
232. PAVIA, H.; TOTH, G. 2000. Inducible chemical resistance in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*. 81: 3212-3225.

233. PEARSE, J.S.; HINES, A.H. 1976. Kelp forest ecology of the central California coast. University of California, Sea Grant College Program Annual Report 1975-76: Sea Grant Publication 57: 56-58.
234. PEARSON, G.A.; HOARAU, G.; LAGO-LESTON, A.; COYER, J.A.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; HENCKEL, K.; SERRAO, E.T.A.; CORRE, E.; OLSEN, J.L. 2010. An expressed sequence tag analysis of the intertidal brown seaweeds *Fucus serratus* (L.) and *F. vesiculosus* (L.) (Heterokontophyta, Phaeophyceae) in response to abiotic stressors. *Marine Biotechnology*. 12: 195-213
235. PENG, Z.; CHENG, Y.; CHIN-MING, B.; KANG, L.; TIAN, Z.; ZHU, Y.; ZHANG, W.; LIANG, Y.; HU, X.; TAN, X.; GUO, J.; DONG, Z.; LIANG, Z.; BAO, L.; WANG, J. 2012. Comprehensive analysis of RNA-seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nature Biotechnology*. 1-9.
236. PICKRELL, J.; MARIONI, J.; PAI, A.; DEGNER, J.; ENGELHARDT, B.; NKADORI, E.; VEYRIERAS, J.; STEPHENS, M.; GILAD, Y.; PRITCHARD, J. 2010. Understanding Mechanisms Underlying Human Gene Expression Variation with RNA Sequencing. *Nature*. 464: 768-772.
237. PHILLIPS, N.; CALHOUN, S.; MOUSTAFA, A.; BHATTACHARYA, D.; BRAUN, E. 2008. Genomic insight into evolutionary relationships among heterokont lineages emphasizing the Phaeophyceae. *Journal of Phycology*. 44: 15-18.
238. PLANA, J.; MANSILLA, A.; PALACIOS, M.; NAVARRO, N. 2007. Estudio poblacional de *Macrocystis pyrifera* L.C. AGARHD (Laminariales: Phaeophyta) en ambientes protegidos y expuestos al oleaje en Tierra del Fuego. *Gayana*. 71: 66-75.
239. POPPER, Z.A.; MICHEL, G.; HERVÉ, C.; DOMOZYCH, D.S.; WILLATS, W.G.; TUOHY, M.G.; KLOAREG, B.; STENGEL, D.B. 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*. 62: 567-590.

240. POTIN, P. 2008. Oxidative Burst and Related Responses in Biotic Interactions of Algae. *Algal Chemical Ecology*. 245 -271.
241. PRIGENT, S.; COLLET, G.; DITTAMI, S. M.; DELAGE, L.; ETHIS, D.E.; CORNY, F.; DAMERON, O.; EVEILLARD, D.; THIELE, S.; CAMBEFORT, J.; BOYEN, C.; SIEGEL, A.; TONON, T. 2014. The genome-scale metabolic network of *Ectocarpus siliculosus* (EctoGEM): a resource to study brown algal physiology and beyond. *The Plant Journal*. 80: 367-381.
242. PROUDFOOT, N.; FURGER, A.; DYE, M. 2002. Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell Research*. 108: 501-512.
243. RAI, L. C., B.; TYAGI, P.; RAI, K.; MALLICK, N. 1998. Interactive effects of UV-B and heavy metals (Cu and Pb) on nitrogen and phosphorus metabolism of a N₂ fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Environmental and Experimental Botany*. 39: 221–231.
244. RAMÍREZ, M.; SANTELICES, B. 1991. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. Monografías Biológicas. N°5. Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
245. RAVEN, J. A. 1996. Inorganic carbon assimilation by marine biota. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*. 203:39–47.
246. RAVEN, J. A.; GEIDER, R.D. 2003. Adaptation, acclimation and regulation of photosynthesis in algae. In *Photosynthesis in Algae*, eds. A. W. D. Larkum, S. E. Douglas, and J. A. Raven, pp. 385–412. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.
247. RAVEN, J. A.; BEARDALL, J.; LARKUM, A.W.D.; SANCHEZ-BARACALDO, P. 2013. The influence of photosynthesis on genome function. *Philosophical Transactions of the Royal Society: B*. 368:20120264.

248. RAVEN, J. A.; BEARDALL, J.; GIORDANO, M. 2014. Energy costs of carbon dioxide concentrating mechanisms in aquatic organisms. *Photosynthesis Research*. 121:111–124.
249. RAVEN, J. A.; RALPH, P.J. 2015. Enhanced biofuel production using optimality, pathway modification and waste minimization. *Journal Applied Phycology*. 27:1–31.
250. RAVEN, J. A.; BEARDALL, J. 2016. *Algal Photosynthesis and Physiology*. Columbia University.
251. REED, R.H.; DAVISON, I.R.; CHUDEK, J.A.; FOSTER, R. 1985. The osmotic role of mannitol in the Phaeophyta: an appraisal. *Phycologia*. 24: 35–47.
252. REED, D.C.; AMSLER, C.D.; EBELING, A.W. 1992. Dispersal in kelps: factors affecting spore swimming and competence. *Ecology* 73: 1577-1585.
253. REED, D.C.; KINLAN, B.P.; RAIMONDI, P.T.; WASHBURN, L.; GAYLORD, B.; DRAKE, P.T. 2006. A Metapopulations perspective on patch dynamics and connectivity of giant kelp. In: Kritzer, J.P., Sale, P.F. (Eds.). *Marine Metapopulations*. Academic Press, San Diego. 353-386 p.
254. RITTER, A.; GOULITQUER, S.; SALAÜN, J.P.; TONON, T.; CORREA, J.A.; POTIN, P. 2008: Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Journal of Phycology*. 180:809-821.
255. RITTER, A.; DITTAMI, S.M.; GOULITQUER, S.; CORREA, J.A.; BOYEN, C.; POTIN, P.; TONON, T. 2014. Transcriptomic and metabolomics analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biology*. 14:116.

256. ROCCHERI, M.C.; ISOLA, M.G.; BOSCO, L.; CASCINO, D.; GIUDICE, G. 1995. Achievement of thermotolerance through hsp phosphorylation in sea urchins embryos. *Cell Biology International*. 19:137–141.
257. RODRIGUEZ-MANZANEQUE, M. T.; ROS, J.; CABISCOL, E.; SORRIBAS, A.; HERRERO, E. 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cellular Biology*. 19:8180-8190.
258. ROEDER, V.; COLLÉN, J.; ROUSVOAL, S.; CORRE, E.; LEBLANC, C.; BOYEN, C. 2005. Identification of stress gene transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *Journal of Phycology*. 41: 1227-1235.
259. ROSS, C.; KÜPPER, F.C.; JACOBS, R.S. 2006. Involvement of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the wound response of *Dasycladus vermicularis*. *Chemical Biology*. 13: 353 - 364.
260. ROSS, C.; KÜPPER, F.C.; VREELAND, V.; WAITE, J.H.; JACOBS, R.S. 2005. Evidence of a latent oxidative burst in relation to wound repair in the giant unicellular chlorophyte *Dasycladus vermicularis* . *Journal Phycology*. 41: 531-541.
261. ROTHMAN, J.E., 1989. Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell*. 59, 591–601.
262. ROUSE, J.; COHEN, P.; TRIGON, S.; MORANGE, M.; ALONSO-LIAMAZARES, A.; ZAMANILLO, D.; HUNT, T.; NEBREDA, A.R., 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates map kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 78: 1027–1037

263. SALGADO, L.T; ANDRADE, L.R.; AMADO FILHO, G.M. 2005. Localization of specific monosaccharides in cells of the brown alga *Padina gymnospora* and the relation to heavy-metal accumulation. *Protoplasma* 225: 123-8.
264. SÁNCHEZ, Y., TAULIEN, J., BORKOVICH, K.A., LINDQUIST, S., 1992. HSP104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO Journal*. 11: 2357–2364.
265. SANTELICES, B.; OJEDA, F. P. 1984. Effects of canopy removal on the understory algal community structure of coastal forest of *Macrocystis pyrifera* from Southern South America. *Journal Marine Ecology Progress*. 14: 165-173.
266. SANTELICES, B. 1990. Patterns of reproduction dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 28: 177-276.
267. SAWABE, T.; MAKINO, H.; TATSUMI, M.; NAKANO, K.; TAJIMA, K.; IQBAL, M.M. 1998. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease in *Laminaria japonica*. *International Journal of Systematic and Bacteriology*. 48: 769-774.
268. SAWABE, T.; TANAKA, R.; IQBAL, M.M.; TAJIMA, K.; EZURA, Y.; IVANOVA, E.P. 2000. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 265-271.
269. SCHIEL, D.R.; FOSTER, M.S. 1986. The structure of subtidal algal stands in temperate waters. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 24: 265–307.

270. SCHOENWAELDER, M. A. E. 2002. The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia*. 41:125-39.
271. SCHRODER, H.T.; LANGER, T.; HARTL, F.U.; BUKAU, B. 1993. DnaK, DnaJ, GrpE from a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO Journal*. 12: 4137–4144.
272. SEKIMOTO, S.; BEAKES, G.W.; GACHON, C.M.M.; MÜLLER, D.G.; KÜPPER, F.C.; HONDA, D. 2008. The development, ultrastructural cytology, and molecular phylogeny of the basal oomycete *Eurychasma dicksonii*, infecting the filamentous phaeophyte algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist*. 159: 299-318.
273. SINHA, R.P.N.; SINGH, A.; KUMAR, H.D.; KUMAR, M.; HADER, D.; HADER, P. 1995. Effects of UV irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 30: 107–113.
274. SHIMONISHI, M.; KUWAMOTO, S.; INOUE, H.; WEVER, R.; OHSHIRO, T.; IZUMI, Y.; TANABE, T. 1998. Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga *Corallina pilulifera*. *FEBS Letters*. 428:105-10.
275. SILVA, J.; SANTOS, R.; SERODIO, J.; MELOR. 1998. Light response curves for *Gelidium sesquipedale* by two methods: O₂-evolution and chlorophyll fluorescence. *Journal Applied Phycology*. 10:295–301.
276. SIMIONATO, D.; BLOCK, M.A.; LA ROCCA, N.; JOUHET, J.; MARÉCHAL, E.; FINAZZI, G.; MOROSINOTTO, T. 2013. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus, *Eukaryotic Cell*. 12: 665-676.

277. SIPOS, G.; KUCHLER, K. 2006. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. *Curren Drug Targets*. 7: 471-481.
278. SKENE, K.R. 2004. Key differences in photosynthetic characteristics of nine species of intertidal macroalga are related to their position on the shore. *Canadian Journal of Botany*. 82:177–184.
279. SMERDON, G.R.; CHAPPLE, J.P.; HAWKINS, A.J.S. 1995. The simultaneous immunological detection of four stress-70 isoforms in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*. 40: 399–407
SMERDON, G.R.; CHAPPLE, J.P.; HAWKINS, A.J.S. 1995. The simultaneous immunological detection of four stress-70 isoforms in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*. 40: 399–407.
280. SMITH, C. M.; SATOH, K.; FORK, D. V. 1986. The effect of osmotic tissue dehydration and air drying on morphology and energy transfer in two species of *Porphyra*. *Plant Physiology*. 80: 843-847.
281. SORENSEN, J. G.; KRISTENSEN, T. N.; LOESCHKE, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*. 6:1025-1037.
282. SOTO, J.; LÓPEZ, C. 2012. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*. Instituto de investigaciones de sanidad vegetal. 16(2): 101-113.
283. STEINBERG, P.D. 1992. Geographical variations in the interaction between marine herbivores and brown algal secondary metabolites. In *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Edited by Paul V.J. pp. 51 – 92. Cornell University Press, Ithaca, NY.
284. STENECK, R. S.; GRAHAM, M. H.; BOURQUE, B. J.; CORBETT, P.; ERLANDSON, J. M.; ESTES, J. A.; TEGNER, M. J. 2002. Kelp forest

- ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environmental Conservation*. 29:436–59.
285. STOOP, J.M.H.; WILLIAMSON, J.D.; PHARR, D.M. 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*. 1: 139–144.
286. STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. 2003. Recent Advances in Betalain Research. *Phytochemistry*. 62: 247-269.
287. STRICKLAND, J.D.H.; PARSON, T.R. 1972. A Practical handbook of seawater analysis. Second Edition. Bulletin 167. Fisheries research board of Canada.
288. STRITTMATTER, M.; GRENVILLE-BRIGGS, L.J.; BREITHUT, L.; WEST, P.; GACHON, C.M.; KÜPPER, F.C. 2016. Infection of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* by the oomycete *Eurychasma dicksonii* induces oxidative stress and halogen metabolism. *Plant, Cell and Environment*. 39:259-271.
289. STUART, M.D.; BROWN, M.T., 1994. Growth and diet of cultivated black-footed abalone, *Haliotis iris* (Martyn). *Aquaculture*. 127(4): 329-337.
290. TAM, S. K.; DUSSEAULT, J.; POLIZU, S.; MÉNARD, M.; HALLË, J.; YAHIA, P.L. 2006. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. *Biomaterials*. 27:1296–305.
291. TERAMOTO, H., NAKAMORI, A., MINAGAWA, J., T-AKI, ONO. 2002. Light-intensitydependent expression of Lhc gene family encoding light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 130:325-333.
292. THEVANAYAGAM, H.; MOHAMED, S.M.; CHU, W.L. 2014. Assessment of UVB-photoprotective and antioxidative activities of carrageenan in keratinocytes. *Journal of Applied Phycology*. 26: 1813–1821.

293. TIMPERIO, A.M.; EGIDI, M.G.; ZOLLA, L. 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal Proteomics* 71:391–411. DOI:[10.1016/j.jprot.2008.07.005](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.07.005).
294. TOLDI, O.; TUBA, Z.; SCOTT, P. 2009. Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science*. 176:187-199.
295. TONKYN, J.C., DENG, X-W., GRUISSEM, W. 1992. Regulation of plastid gene expression during photooxidative stress. *Plant Physiology*. 99:1406-1415.
296. TOTH, G.B.; PAVIA, H. 2000. Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 97: 14418-14420.
297. TOWLE, D.W.; PEARSE, J.S. 1973. Production of the giant kelp, *Macrocystis* estimated by in situ incorporation of ¹⁴C in polyethylene bags. *Limnology and Oceanography*. 18: 155-159.
298. TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. 2009. Tophat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 25: 1105-1111.
299. UNDERWOOD, G. J. C.; NILSSON, K.; SUNDBACH, K.; WULFF, A. 1999. Short-term effects of UV-B radiation on chlorophyll fluorescence, biomass, pigments and carbohydrate fractions in a benthic diatom mat. *Journal of Phycology*. 35: 656– 666.
300. UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 1; 40(15):e115.

301. VÁSQUEZ, J.A. 1999. The effect of harvesting of brown seaweeds: A social, ecological and economic importance resource. *Journal World Aquaculture*. 31(1): 19-22.
302. VÁSQUEZ, J. A., VÉLIZ, D. & PARDO, L. M. 2001. Biodiversidad bajo las grandes algas. In *Sustentabilidad de la Biodiversidad: Un problema actual, bases científico-técnicas, teorizaciones y perspectivas*, K. Alveal & T. Antezana (eds.), Concepción: Universidad de Concepción, 293-308 p.
303. VÁSQUEZ, J. A. 2009. Estudio de investigación de poblaciones y de las condiciones de viabilidad ecológica de las actividades extractivas de algas pardas e invertebrados en la zona costera sur, en apoyo de la investigación y desarrollo del Instituto del Mar del Perú IMARPE. Informe Final. Proyecto UE – Perú/PENX. Ala 2004/016 -913. Código Ref. Mincetur POG 3.3.2.1. Sector Pesca y Acuicultura. Lima. 90 p.
304. VIANA, M.T., CERVANTES-TRUJANO, M., SOLANA-SANSORES, R. 1994. Attraction and palatability activities in juvenile abalone (*Haliotis fulgens*): nine ingredients used in artificial diets. *Aquaculture*, 127(1): 19-28.
305. VIANA, M.T., LÓPEZ, L.M., GARCÍA-ESQUIVEL. Z., MÉNDEZ, E. 1996. The use of silage made from fish and abalone viscera as ingredient in abalone feed. *Aquaculture*. 140(1-2): 87-98.
306. VREELAND, V.; WEITE, J. H.; EPSTEIN, L. 1998. Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *Journal Phycology*. 34:1-8.
307. WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. 2009. RNA-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews, Genetics*. 10: 57-63.
308. WANG, W. J.; WANG, F. J.; SUN, X. T.; LIU, F. L.; LIANG, Z. R. 2012. Comparison of transcriptome under red and blue light culture of *Saccharina japonica* (Phaeophyceae). *Planta*. 237:1123–1133.

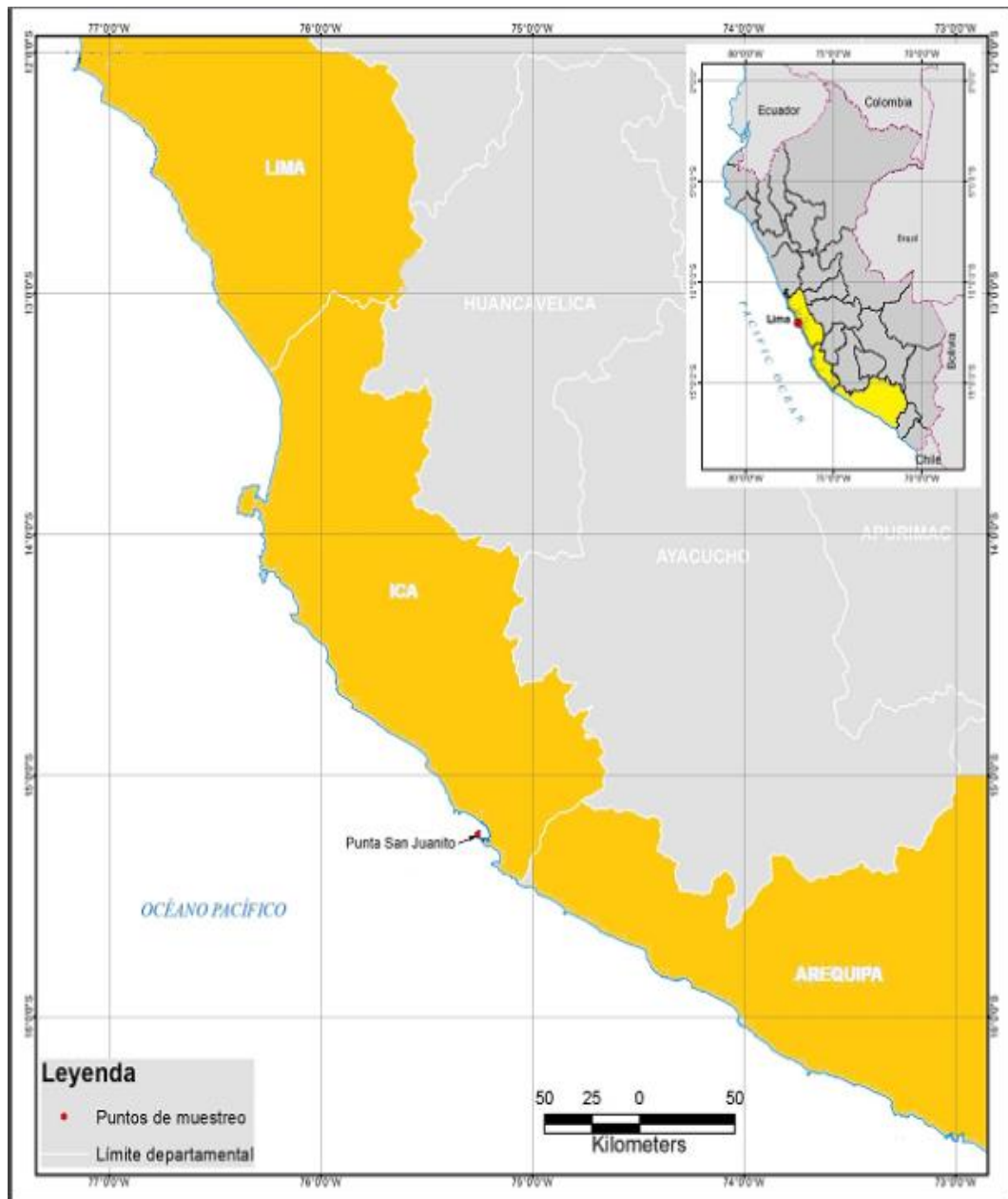
309. WANG, L.; MAO, Y.; KONG, F.; CAO, M.; SUN, P. 2015. Genome-wide expression profiles of *Pyropia haitanensis* in response to osmotic stress by using deep sequencing technology. BMC Genomics. 16:1012. DOI [10.1186/s12864-015-2226-5](https://doi.org/10.1186/s12864-015-2226-5).
310. WARD, J.; PONNALA, L.; WEBER, C. 2012. Strategies for transcriptome analysis in non-model Plants. American Journal of Botany. 99 (2): 267-276.
311. WEI, N.; QUATERMAN, J.; JIN, Y.S. 2013. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. Trends in Biotechnology. 31: 70–77.
312. WEIZHONG, LI.; GODZIK, A. 2006. Bioinformatics. 22:1658-9.
313. WEYAND, M.; HECHT, H. J.; KIESS, M.; LIAUD, M. F.; VILTER, H.; SCHOMBURG, D. 1999. X-ray structure determination of a vanadium dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. Journal Molecular Biology. 293: 595-611.
314. WU, X.; LIU, M.; DOWNIE, B.; LIANG, C.; JI, G. 2011. Genome-wide landscape of polyadenylation in *Arabidopsis* provides evidence for extensive alternative polyadenylation. Proceedings of the National Academy of Science. 108: 12533–12538.
315. WU, SHUANGXIU.; SUN, JING.; CHI, SHAN.; WANG, LIANG.; WANG, XUMIN.; LIU, CUI.; LI, XINGANG.; YIN, JINLONG.; LIU, TAO.; YU, JUN. 2014. Transcriptome sequencing of essential marine brown and red algal species in China and its significance in algal biology and phylogeny. Acta Oceanologica Sinica. 33(2): 1–12. DOI: [10.1007/s13131-014-0435-4](https://doi.org/10.1007/s13131-014-0435-4)
316. XIAO, Y.; ZHANG, J.; CUI, J.; FENG, Y.; CUI, Q. 2013. Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress. Bioresource Technology. 130: 731-738.

317. YAENO, T.; MATSUDA, O.; IBA, K. 2004. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant Journal*. 40: 931- 941.
318. YOSHIOKA, H.; SUGIE, K.; PARK, H.J.; MAEDA, H.; TSUDA, N.; KAWAKITA, K. 2001. Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactive* 14: 725-736.
319. YOUNG, M.D.; WAKEFIELD, J.M.; SMYTH, G.K.; OSHLACK, A. 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*. 11:R14.
320. YUAN, Y. V.; WESTCOTT, N. D.; HU, C.; KITTS, D. D. 2009. Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. *Food Chemistry*. 112: 321-328.
321. ZAGDAŃSKA, B. 1995. Respiratory energy demand for protein turnover and ion transport in wheat leaves upon water demand. *Physiology Plant*. 95: 428-436.
322. ZAMBON, A.C.; GAJ, S.; HO, I.; HANSPERS, K.; VRANIZAN, K. 2012. GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation. *Bioinformatics* 28: 2209–2210. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts366](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts366).
323. ZAVALA, J. 2011. Macroalgas pardas y su uso sostenible. Ministerio del Ambiente MINAM, Instituto del Mar del Perú IMARPE. Dirección General de diversidad Biológica – MINAM. Dirección de Investigaciones de Recursos Demersales y del Litoral. 16 p.
324. ZENONI, S.; FERRARINI, A.; GIACOMELLI, E.; XUMERLE, L.; FASOLI, M.; MALERBA, G.; BELLIN, D.; PEZZOTTI, M.; DELLEDONNE, M. 2010. Characterization of Transcriptional Complexity during Berry Development in *Vitis vinifera* Using RNA-Seq. *Plant Physiology*. 152: 1787-1795.

325. ZOU, D.; GAO, K. 2002. Effects of desiccation and CO₂ concentration on immersed photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China. *European Journal of Phycology*. 37: 587-592.
326. ZOU, D.; GAO, K. 2009. Effects of elevated CO₂ on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. *Phycologia*. 48:510-517.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Mapa con la ubicación geográfica de la localidad de muestreo de *Macrocytis pyrifera*. Escala 1:2'500.000



ANEXO 2. Análisis de microscopía: Microanálisis de Dispersión de Energía EDX en *Macrocystis pyrifera*. Lecturas en muestras a 0 m de la superficie (T2A).

PARED CELULAR	Primera lectura		Segunda lectura		Tercera lectura		Promedios	
Elemento	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)
Carbono	46.75	65.12	49.94	66.90	42.99	66.36	46.56	66.13
Oxígeno	26.26	27.46	25.06	25.20	23.65	27.41	24.99	26.69
Azufre	0.74	0.39	3.02	1.52	0.77	0.45	1.51	0.79
Sodio	4.64	3.38	5.25	3.67	2.02	1.63	3.97	2.89
Calcio	0.59	0.24	0.26	0.11	0.51	0.23	0.45	0.19
PARENQUIMA	Primera lectura		Segunda lectura		Tercera lectura		Promedios	
Elemento	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)
Carbono	38.26	56.63	41.55	56.52	42.13	62.11	40.65	58.42
Oxígeno	33.03	36.70	37.44	38.24	26.63	29.47	32.37	34.80
Azufre	0.95	0.52	0.22	0.11	1.09	0.60	0.75	0.41
Sodio	2.93	2.26	3.68	2.61	3.77	2.91	3.46	2.59
Calcio	0.32	0.14	0.25	0.10	1.02	0.45	0.53	0.23

ANEXO 3. Análisis de microscopía: Microanálisis de Dispersión de Energía EDX en *Macrocytis pyrifera*. Lecturas en muestras a 10 m de la superficie (T2B).

PARED CELULAR	Primera lectura		Segunda lectura		Tercera lectura		Promedios	
Elemento	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)
Carbono	38.99	57.72	16.27	54.39	21.90	57.84	25.72	56.65
Oxígeno	23.23	25.83	9.08	22.79	12.94	25.65	15.08	24.76
Azufre	0.86	0.48	2.19	2.74	0.00	0.00	1.02	1.07
Sodio	4.85	3.75	0.90	1.57	2.30	3.17	2.68	2.83
Calcio	1.29	0.57	2.03	2.03	1.75	1.39	1.69	1.33
PARENQUIMA	Primera lectura		Segunda lectura		Tercera lectura		Promedios	
Elemento	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)	Peso (Wt) %	Composición atómica (%)
Carbono	20.80	38.50	36.48	59.47	41.28	60.04	32.85	52.67
Oxígeno	21.90	30.42	26.41	32.33	31.16	34.02	26.49	32.26
Azufre	8.91	6.18	0.67	0.41	0.12	0.07	3.23	2.22
Sodio	2.10	2.03	3.17	2.70	3.55	2.70	2.94	2.48
Calcio	18.39	10.20	1.08	0.53	0.61	0.26	6.69	3.66

ANEXO 4. *Primers* para validación de genes del transcriptoma global de *Macrocystis pyrifera* en PCR en Tiempo Real.

Nombre del gen/Proteína	Regulación	Fold change	Forward primer	Reverse primer	% GC	Tamaño de producto	Tm
Vanadium-dependent bromoperoxidase	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	16,05818873	CCTCGGTGTAGATGGTGTGCG	CTACATGACCGCTACGACC	60/60	146	59.9 C/ 60.0
Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	ONLY T2B (10 m)	278,6339568	GGTTTGGGATTGACAAAGAG	CCAGCTCCGCAGTAGTAAGG	50/60	112	59.7/60
Glutamate synthase (Ferredoxin-dependent) (EC 1.4.7.1)	ONLY T2B (10 m)	821,7340422	CAGCTGCCAGAACAGTGGTA	GAGTAAACAGCCCTGTTGGA	55/55	131	60/60.1
Glutamate synthase (NADH/NADPH-dependent)	ONLY T2B (10 m)	113,3426265	CTCAGAGGGAAGGCAAACTG	GACGTTGCTTGAACGAGTCT	55/55	104	60/60.5
NAD(P)H-Nitrate reductase (EC 1.7.1.1)	ONLY T2B (10 m)	602,6049643	GGAGGAGGGAAGAAAGGTGAC	CAGAAAGCAACGACCAAGTA	60/55	125	60/60
Glycine dehydrogenase (Decarboxylating) (EC 1.4.4.2)	ONLY T2B (10 m)	3657,188749	CCTCCTTGTCTCTCCAATGA	CAACCCACTGCCTCTCTCTC	55/60	134	60.2/60
Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	ONLY T2B (10 m)	41,55896305	TACTGGCACA TGCTGAGGAC	CTGCA GTCTGCTCACTTCCA	55/55	146	59.9/60.3
Urease accessory protein UreF	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,04460608	TCTAGCGGCCAACTAAAGA	GCGCTAGGAGTGGAGGAAC	50/63.2	104	60/60
Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,104403085	CTCCTAGCCA TCGTCTCTG	GACCA TGGTGGAGGACATCT	60/55	142	60/59.8
Glutathione peroxidase	ONLY T2B (10 m)	90,67410121	GATGTCTGTCGGTGGATACT	TCTGAAGTCGAGTCTGGTG	55/55	111	59.8/60.2
Light harvesting complex protein	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	1450,589715	ACGGCACCATAAAGATAAC	GTCTGGTTC AAGCTGGTTC	50/55	128	59.8/59.7
Rieske (2Fe-2S) region	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	7,705481629	GAGAAAGCGGAAACGCAATAC	CTCGCTCCACGGTAGTAAGC	50/60	103	59.9/60
Aquaporine	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,171633729	TAGGCAACCTGGTCTCATC	GAGCCAAAACACCCAGTGAT	55/50	110	60.1/60
Heat shock protein 90	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	197,6049335	GCTGAGAAAGAGGTCCGATG	GGTCA TCCAGGCTAAAACCA	55/50	107	60/59.9
Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,080859361	AAACGACGGAAATAGGTGCAG	GGAGGGACCACTGCTCTACA	50/60	110	60.1/60.3
50S ribosomal protein L31, chloroplastic	ONLY T2B (10 m)	71,78366346	CCTTTCTA CCTCGGCAACAG	GAGGGCAAAA CAATCTCAC	55/50	131	59.9/59.5
50S ribosomal protein L11, chloroplastic	ONLY T2B (10 m)	187,0153337	GGCCCTAGAACAGGTAAGG	TAGCCGGCTTTATCAGCAGT	60/50	123	60.2/60
Lipoxygenase	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	12,69921575	CCTCTTGCTGACCAACAACA	GGATAGCGGGAGAAAGAAAC	50/55	133	59.9/60
Branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,159404468	CACGGATGAATCTGTTCACG	CTGCTCCCTGAGCCGATAG	50/60	134	60.1/60
Serine/threonine-protein kinase CTR1	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,084294954	GGACAGAGACCTTGACAGC	CAGTCGGCTAGAGCTCATC	60/60	130	60.1/60.1
Casein kinase II alpha subunit	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	12,29853343	GAAAGCTCATGGAGCAATCA	GTACAGGTACACCCGCTCGT	50/60	106	60/60.1
Serine/threonine-specific protein kinase-like protein	ONLY T2B (10 m)	59,50487892	GAAAGTCGACGGGAAAGAAACA	GGTGTATTGACGCCATGTTG	50/50	105	60.2/59.8
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	ONLY T2B (10 m)	127,5104548	CTACAACCTCTCCCCAGCAG	GTCTTGGCTCCAGCATGGT	60/55	105	59.9/60.1
Pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1)	ONLY T2B (10 m)	188,9043775	TGACATGGGGTTTCTCCTC	GAGTGCTCAGCCCTAGTTG	50/60	145	59.9/60
Aspartate Aminotransferase (EC 2.6.1.1)	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,089299708	CACATAGATGGGCGTTTCT	CACGTGCTCTCGCTCTGTAG	50/60	127	60/59.9
Isoleucyl-tRNA Synthetase (EC 6.1.1.5)	ONLY T2B (10 m)	45,3370506	GGCTTGTCTTGTCTGAGAC	CCGAAACAACAGGGGAGTTTA	55/50	131	60/60
Leucyl-tRNA Synthetase (EC 6.1.1.4)	ONLY T2B (10 m)	120,8988016	CATGGGACCA TTTTCGAGACT	AGGGTGA GCCAACAAATCAAC	50/50	101	59.9/60
DEAD box helicase	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	10,02383816	CGCTATCGTATTCAACGAGA	AGTGATATCGCGCTGGTCT	50/50	121	60/59.9
3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase (EC 2.5.1.54)	ONLY T2B (10 m)	137,9001956	GACCTCCAATGCAATCTGT	GAGCTGAATTGAGGGCAATC	50/50	109	59.9/59.8

Continuación

Nombre del gen/Proteína	Regulación	Fold change	Forward primer	Reverse primer	% GC	Tamaño de producto	Tm
Shikimate Kinase (EC 2.7.1.71)	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	5,45620054	CTCCACGATGTCCTTGGTCT	ACCAAGTCCACTCCTACGTG	55/60	131	60.1/60
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (EC 4.1.1.39)	ONLY T2B (10m)	207,7948153	AGGTCACGTCCTCATTACG	TCGGTGGAGGAACTTTAGGA	55/50	106	60/59.7
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) (EC 1.1.1.34)	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	45,05214061	CGCACATGGCTCTAAACAGA	ATGGCCTCAGAGGTGACAAC	50/55	112	60/60.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1/ NADH dehydrogenase	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	381,2332954	GCTATCAACGCTCGGTAG	CTTTGCAAGGAGGCCAAAG	60/50	142	59.9/60.1
Magnesium chelatase subunit H, putative chloroplast (EC 6.6.1.1)	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	1486,274579	TTGACCGAGCTGTGAAGATG	CTGAAGCGTTGGAGAGACC	50/55	141	60/60
Long-chain acyl-CoA synthetase	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	6,935886327	CCTAAGCACCCGACAGAAAC	GCGTGTGTCTTTGACGCA	55/50	110	60/60
Udp-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	17,93801638	CGTCTGTACCAACGGTCCT	TCCACCGATTCTCCTACCAC	55/55	138	60/59.9
Galactose-4-epimerase, UDP	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	10,72864319	TACCCCGAAGACAATCCTTG	ACCCCTCTCAGGCTCTCCTC	50/60	138	59.9/60
ABC transporter-like	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	6,791048069	AGGACCTAAGCAGGAGGAAG	GACCCCACTCGTCACAGACTT	60/55	130	60/60
Malate synthase (EC 2.3.3.9)	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,02856547	ACGTACACGATGCACACCTC	TTAACGAGCAGATGCCTCAG	55/50	145	59.6/60
Similar to ubiquitin specific protease 34	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,054397658	ACACAACCAACAGCCGTAG	GTGAGCAGACGGATAGACC	55/60	107	59.7/59.8
Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	DOWN (T2A vs T2B DOWN REGULATED)	0,138672782	GTAAGTATCGGCTGTGTGTG	CGCCAAGAAGAGCCTACATC	55/55	106	60.2/60
Transposase	ONLY T2A (0m)	52,93683572	GCTCGAACCACTCCAATGAAT	GGTACAGAGGAAACCGACGA	50/55	100	60.1/60.1
FHA-HIT protein	ONLY T2A (0m)	112,2260917	TCCGAAGAGGCTGGTTATG	TCAGAACCAACCCAGAAAAG	50/50	142	60.2/60.1
Gibberellin 2-beta-dioxygenase (EC 1.14.11.13)	ONLY T2A (0m)	76,22904344	AGTAAAGAAAGCAGCCGAGT	GGAAAGCGACGATGCTAGAC	50/55	150	60/60
Isocitrate lyase	ONLY T2A (0m)	497,6062558	CCAACCTGGAGACATTTACG	ACGGTGTGTAACGGTATGTC	55/60	102	60.4/59.9
Polymorphic Outer membrane protein G/I family	ONLY T2A (0m)	391,7325843	CTGTGTGCTTCGATCAACAT	GCTGACTGCTGTGCTTGT	50/55	130	60/60.3
S-adenosylmethionine synthase (EC 2.5.1.6)	ONLY T2B	297,5243946	GCATCGAAGACGATCAGA	CCTCTCGCAACCAAGACTC	50/55	142	60.1/60
Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase type 1	ONLY T2B	53,83774759	GTTGGAAGATTTGGCTCCAG	CGCGACTGGGATCTCAATT	50/50	111	59.7/60.1
4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase, chloroplast	ONLY T2B	212,5174247	AGTTGAGAGGCCGTCCAAA	CCATCTCCTCTAACCGCTTG	50/55	119	60/59.8
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	ONLY T2B	357,9737954	CGTAAACGACAGTGGTGGTG	CCCTGCTAGAGACGACCTTG	55/60	146	60.1/60
Aldehyde Dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	ONLY T2B	292,8017852	AGTCTCCGCCAGTTAGTGA	AGTCATCGCGAAAGAGTTTG	55/50	106	59.9/60.4
Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	ONLY T2B	2550,209097	CCTAACGTTCTCGGGTCTGC	GGTGGCAAATCCGAGGTAGA	55/55	144	59.9/59.9
Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	ONLY T2B	207,7948153	AGGGGCTTGGTTCCTGACT	CTTGCAATGCCCTTCTCTG	55/55	114	60/60
Fructose-bisphosphatase (EC 3.1.3.11)	ONLY T2B	634,7187085	GGTTGGCACACATTCACAAC	GCTGTTCCACAGGTTCCAT	50/50	125	59.9/60
Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)	UP (T2A vs T2B UP REGULATED)	17,34680881	GCAAACGAAACGGTATGACCT	TACGCTGGGAGGAAAAACAC	50/50	146	60/60.1
L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase EC 1.3.2.3	ONLY T2B	45,3370506	CGAGATACCTGCTCCTGCTC	TCTCTGACGACATCCATTG	60/50	148	60.1/59.9

ANEXO 5. Listado de genes con expresión significativamente diferenciales en *Macrocystis pyrifera* a 0 m (T2A) y T2B (10 m).

Nombre del Gen/Proteína	Regulación	Fold change	pValue	Función
Vanadium-dependent bromoperoxidase	Alta en 0 m	6.8914	0.0222098808	Defensa antioxidante
Urease accessory protein UreF	Alta en 0 m	22.4184	0.0317399721	Ciclo de Urea, GABA y proline
Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	Alta en 0 m	9.5782	0.0096688523	Síntesis de Glutati3n y defensa antioxidante
Light harvesting complex protein	Alta en 0 m	16.4412	0.0017643654	Fotosíntesis
Rieske (2Fe-2S) region	Alta en 0 m	39.0188	0.0003381751	Genes relacionados a la fotosíntesis, fotosistema 2, transporte de electrones, sensibilidad a la luz y síntesis de carotenoides.
Aquaporin	Alta en 0 m	30.4891	0.0091832762	Sistema de transportaci3n (Transporte de iones y agua)
Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	Alta en 0 m	12.3671	0.0040478809	Respuesta al calor y estr3s oxidativo (desecaci3n). Síntesis de chaperones.
Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit	Alta en 0 m	6.2733	0.0350976028	Aminoácidos de cadena ramificada.
Serine/threonine-protein kinase CTR1	Alta en 0 m	11.8631	0.0415284001	Aminoácidos de cadena ramificada, Defensa antioxidante

Aspartate Aminotransferase (EC 2.6.1.1)	Alta en 0 m	11.1982	0.0075979684	Aminoácidos de cadena ramificada, Defensa antioxidante
Similar to ubiquitin specific protease 34	Alta en 0 m	18.3831	0.0151442253	Reciclaje de proteínas.
Similar to ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	Alta en 0 m	6.5190	0.0458993508	Metabolismo energético.
Monophenol Monooxygenase	Alta en 0 m	27.0267	0.000428844	Biosíntesis de Betalaina.
Alkaline phosphatase	Alta en 0 m	19.2381	0.0022184014	Vía: NAD/NADH fosforilación y desfosforilación (Respuesta al estrés oxidativo to oxidativo)
Oxidoreductase (Arsenate reductase. Glutaredoxin)	Alta en 0 m	10.3163	0.0069709376	Detoxificación de arsenato
DNA helicase (EC 3.6.4.12)	Alta en 0 m	2.6621	0.0090710198	DNA helicasas utiliza la energía de la hidrólisis de ATP.
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	Alta en 0 m	12.4255	0.0092518168	Metabolismo de Metionina, metabolismo de compuestos de seleno, Biosíntesis de L-metionine.
DEAD box helicase (EC 3.6.4.13)	Alta en 0 m	9.9354	0.0363002914	Un trifosfato de nucleósido + H ₂ O = un difosfato de nucleósido + fosfato Mecanismo catalítico.
Lactoylglutathione lyase, putative	Alta en 0 m	9.8005	0.0141131854	Metabolismo del Piruvato. Degradación I del metilglioxal.

Ubiquitin-conjugating enzyme, putative	Alta en 0 m	5.5672	0.04170213	Vía de Proteínas de ubiquitinación.
Ankyrin 3.6.1.15 (NTPase)	Alta en 0 m	7.3078	0.02370033	Fosforilación oxidativa.
Gamma-glutamyl transpeptidase (EC 2.3.2.2)	Alta en 0 m	8.8739	0.03232579	Metabolismo de glutatión.
Monogalactosyldiacylglycerol synthase, family GT28 (EC 2.4.1.46)	Alta en 0 m	6.9442	0.03697278	Biosíntesis I de galactofosfolípidos
Serine/Threonine Dehydratase (EC 4.3.1.-) L-serine ammonia-lyase.	Alta en 0 m	6.4735	0.02875467	Metabolismo de serine y treonine.
Patatin (EC. 3.1.1.4)	Alta en 0 m	8.9673	0.04265161	Metabolismo de fosfolipasas
Acetoacetate--CoA ligase (EC 6.2.1.16)	Alta en 0 m	6.7772	0.04515125	Degradación de Valina y leucina degradation. Metabolismo de butanato
Carbohydrate kinase 2.7.1.14	Alta en 0 m	5.6828	0.04656553	Respiración aeróbica I - III
Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial (DHODEHase) (EC 1.3.5.2)	Alta en 0 m	5.3654	0.04693179	Metabolismo de pirimidina.
Lipoxygenase	Alta en 0 m	18.02	0.001319908	Metabolismo de ácidos grasos y defensa antioxidante.
ABC transporter-like	Baja en 0 m	0.1472	0.03404662	Señalización celular.
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1/ NADH dehydrogenase (Ubiquinone) (EC 1.6.5.3)	Baja en 0 m	0.0026	1.40E-07	Respiración aeróbica I - III
Shikimate Kinase	Baja en 0 m	0.1832	0.04200643	Aminoácidos aromáticos

Udp-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase	Baja en 0 m	0.0557	0.00209323	Metabolismo energético
Galactose-4-epimerase, UDP	Baja en 0 m	0.932	0.00831223	Biosíntesis de UDP-D-galactosa.
Long-chain acyl-CoA synthetase	Baja en 0 m	0.1441	0.02197075	Metabolismo energético.
Casein kinase II alpha subunit	Baja en 0 m	0.0813	0.02875841	Aminoácidos de cadena ramificada.
Magnesium chelatase subunit H, putative chloroplast (EC 6.6.1.1)	Baja en 0 m	0.0006	4.834E-09	Metabolismo de clorofila
Mannose-6-phosphate isomerase	Baja en 0 m	0.0463	0.0170957	Biosíntesis I de L-ascorbato (Vía L-galactose) Vía Smirnoff-Wheeler.
Transposase	Sólo en 0 m		0.01483208	Mecanismo de Replicación y transposición
FHA-HIT protein	Sólo en 0 m		0.00128322	Síntesis de aprataxina
Gibberellin 2-beta-dioxygenase	Sólo en 0 m		0.004783	Biosíntesis de dipertenoides; inactivación I de giberelinas.
Isocitrate lyase	Sólo en 0 m		1.63E-06	Gluconeogenesis
Polymorphic Outer membrane protein G/I family	Sólo en 0 m		5.38E-06	Componentes de la membrana
Polymorphic outer membrane protein	Sólo en 0 m		1.2758E-05	Componentes de la membrana
Light harvesting complex protein	Sólo en 10 m		0.02008396	Fotosíntesis

NAD(P)H-Nitrate reductase (EC 1.7.1.1)	Sólo en 10 m		8.64E-07	Asimilación de Nitrógeno
Glycine dehydrogenase (Decarboxylating)	Sólo en 10 m		2.328782E-10	Fotorespiración y disponibilidad de carbono
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	Sólo en 10 m		0.00097953	Aminoácidos de cadena ramificada.
Pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1)	Sólo en 10 m		0.00083066	Aminoácidos de cadena ramificada.
Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	Sólo en 10 m		0.00013577	Metabolismos del Piruvato. Branched-chain amino acids
Serine hydroxymethyltransferase	Sólo en 10 m		0.03295779	Fotorespiración y disponibilidad de carbono.
S-adenosylmethionine synthase	Sólo en 10 m		0.00431818	Síntesis de etileno.
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Sólo en 10 m		1.1215E-05	Vía: Glicolisis IV (cytosol vegetal)
Triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Sólo en 10 m		8.47E-11	Gluconeogenesis. Fotosíntesis.
Aldehyde Dehydrogenase	Sólo en 10 m		2.9078E-05	Glicolisis / Gluconeogenesis
Fructose-bisphosphate aldolase	Sólo en 10 m		5.89E-10	Glicolisis / Gluconeogenesis
L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase	Sólo en 10 m		0.02630423	Biosíntesis de L-ascorbato I (Vía L-galactosa) Vía Smirnoff-Wheeler.
Formaldehyde dehydrogenase (EC 1.1.1.284)	Sólo en 10 m		0.00160783	Metabolismo de metano, oxidación del formaldeido
Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit) (EC 4.1.1.39)	Sólo en 10 m		0.00013577	Fotorespiración



First global transcriptome analysis of brown algae *Macrocystis integrifolia* (Phaeophyceae) under marine intertidal conditions

Erika Salavarría¹ · Sujay Paul^{1,3} · Patricia Gil-Kodaka² · Gretty K. Villena¹

Received: 18 October 2017 / Accepted: 8 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

To understand the physiological responses of the brown macroalga *Macrocystis integrifolia* during the marine tidal cycle, two RNA libraries were prepared from algal frond samples collected in the intertidal zone (0 m depth) and subtidal zone (10 m depth). Samples collected from intertidal zone during low tide was considered as abiotic stressed (MI0), while samples collected from subtidal zone was considered as control (MI10). Both RNA libraries were sequenced on Illumina NextSeq 500 which generated approx. 46.9 million and 47.7 million raw paired-end reads for MI0 and MI10, respectively. Among the representative transcripts (RTs), a total of 16,398 RTs (39.20%) from MI0 and 21,646 RTs (39.24%) from MI10 were successfully annotated. A total of 535 unigenes (271 upregulated and 264 downregulated) showed significantly altered expression between MI0 and MI10. In abiotic-stressed condition (MI0), the relative expression levels of genes associated with antioxidant defenses (vanadium-dependent bromoperoxidase, glutathione S-transferase, lipoxigenase, serine/threonine-protein kinase, aspartate Aminotransferase, HSPs), water transport (aquaporin), photosynthesis (light-harvesting complex) protein were significantly upregulated, while in control condition (MI10) most of the genes predominantly involved in energy metabolism (NADH-ubiquinone oxidoreductase/NADH dehydrogenase, NAD(P)H-Nitrate reductase, long-chain acyl-CoA synthetase, udp-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase) were overexpressed.

Keywords *Macrocystis integrifolia* (Phaeophyceae) · Abiotic stress · Transcriptome analysis · De novo assembly · Differential gene expression

Introduction

Brown algae (Kingdom: Chromista; class: Phaeophyceae) are probably the most abundant photosynthetic inhabitants of the intertidal zone. Like other organisms of the intertidal zone, brown alga is also subjected to recurring, harsh changes in the environment associated with life in the

interface of terrestrial and marine habitats. These changes include, but are not limited to, desiccation, osmotic pressure, temperature, nutrients, light, and tidal flow (Kupper et al. 2008). However, little is known about the physiological processes in the brown algae which allow them to adapt to such abiotic stress conditions. In macroalgae, the intensity of the effects generated by the abiotic stresses is related to the vertical distribution range of these species in the intertidal zone (López-Cristoffanini 2013). Several species of brown macroalga are economically very important. The economic interest of brown macroalga is related mainly due to their use in the industrial production of polysaccharides (McHugh 2003; Bixler and Porse 2011; Synytsya et al. 2015). For example, alginate, a brown algal cell wall polysaccharide, is used both for pharmaceutical purposes (Tonnesen and Karlsen 2002; Thanh-Sang Vo et al. 2012) and in the food industry (Jensen 1993; Hafting et al. 2012; Fleurence 2016; Chapman 2015). Economically important *Macrocystis integrifolia* is one of four morphotypes of kelp (large brown algae) in the genus *Macrocystis* which lives in intertidal zone along the Pacific

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1204-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gretty K. Villena
gkvch@lamolina.edu.pe

- ¹ Laboratorio de Micología y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, 12 Lima, Peru
- ² Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru
- ³ Present Address: Azul Natural S.A. de C.V., Durango, Mexico

coast of North America, Peru and Chile (Alveal 1995) and is moderately tolerant to abiotic stresses. However, to date, the cellular and molecular responses, as well as abiotic stress tolerance factors of brown algae are not well-studied. Hence, the main objective of this study is to analyze the effect of abiotic stresses in brown algae *M. integrifolia* under intertidal condition using global transcriptome data.

Data description

Sample collection and maintenance

Samples from six individual plants of *M. Integrifolia*, three of each condition were collected at two sampling points in the rocky intertidal zone of Punta San Juanito, Ica, Peru (Table 1). Samples collected from intertidal zone (0 m) during low tide after 2 h of air exposure as well as from subtidal zone (10 m). Small pieces of tissues (approx. 2 cm²) were cut from fresh fronds and were promptly cleaned with ethanol for removing epiphytes and immediately frozen in liquid nitrogen until further analysis. In this study, the samples from 0 and 10 m were marked as MI0 and MI10, respectively. MI10 represented the control samples, while MI0 represented the natural abiotic-stressed samples.

RNA extraction and preparation of cDNA library for RNAseq

Total RNA was extracted from the samples MI0 and MI10 using RNAeasy mini kit (Quiagen) and treated with RNase free DNase (Quiagen) to remove the residual genomic DNA. RNA quantity and quality were assessed with NanoDropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and 2100 Bioanalyzer (AGILENT). Library preparation was performed by Illumina TruSeq RNA library protocol. Briefly, 1 g of Total RNA was subjected to Poly A purification of mRNA. Purified mRNA was fragmented for 2 min at elevated temperature (94 °C) in the presence of divalent cations and reverse transcribed with Superscript III Reverse transcriptase by priming with Random Hexamers. Second strand cDNA was synthesized in the presence of DNA Polymerase I and RnaseH. The cDNA was cleaned up using HighPrep PCR (MAG-BIO, Cat# AC-60050) and Illumina adapters were ligated to the cDNA molecules after end repair and addition of A base. SPRI cleanup was performed after ligation. Each of the two libraries was amplified using 8 cycles of PCR for the enrichment of adapter-ligated fragments. The prepared library was quantified using Qubit and validated for quality by running an aliquot on High Sensitivity Bioanalyzer Chip (Agilent). Based on the population observed in the profile,

Table 1 MixS information of *Macrocystis integrifolia*

Item	Definition
General feature of classification	
Classification	Eukaryota; Heterokonta; Phaeophyceae; Laminariales; Laminariaceae; <i>Macrocystis integrifolia</i>
Investigation type	Eukaryote transcriptome
Project name	Bioproject PRJNA322132
Environment	
Geographic location	Zona Rocosa de Punta San Juanito, Ica, Perú
Latitude, longitude	15°14'43.2"S, 75°15'31.9"W
Collection date	2015-04
Isolation environment	Ocean
Depth	0 and 10 m of water depth
Biome	ENVO:01000320 (marine environment)
Collector (s)	Erika Salavarría and Sujay Paul
Sequencing	
Sequencing	Illumina NextSeq 500; Paired-end (2 × 151 bp Max)
Assembly	
Method	De novo assembly
Program	trinityrnaseq_r20140717
Finishing strategy	High-quality transcriptome assembly
Data accessibility	
Sequence information	Genbank accession SRA426960

the libraries were sequenced on Illumina NextSeq 500 at Genotypic Technology Private Limited, Bangalore, India.

Data filtering, de novo transcriptome assembly, and functional annotation

The Illumina NextSeq 500 paired-end raw reads were first quality checked using FastQC (Andrews, 2010) and then processed by the in-house script for adapters and low-quality bases trimming towards 3'-end. De novo assembly of Illumina NextSeq 500 processed data was performed using trinityrnaseq (Grabherr et al. 2011) with default K-mer = 25. Transcripts having length ≥ 300 bp have been considered, followed by clustering of these transcripts with 95% identity using CD-HIT (Li and Godzik 2006) which resulted into COG's. The assembled transcripts were then annotated using NCBI BLAST 2.2.31 (Altschul et al. 1990) with the protein sequences of brown algae *Ectocarpus siliculosus* available at UniProt Protein Database. The same Uniprot protein database was used for Gene Ontology (GO) annotation and transcripts were assigned GO subcategories under biological process (BP), molecular function (MF) and cellular component (CC). Differential gene expression (DGE) between the samples was performed by employing a negative binomial distribution model with DeSeq v1.8.1 tool (Anders and Huber 2010). Briefly, transcripts of both MI0 and MI10 samples were combined to the size ≥ 300 bp and were clustered together using CD-HIT at 95% identity. Consequently, master control transcriptome data (uni-genes) were generated. The RPKM measurement (readings per kilobase of transcribed per million mapped readings) was then performed using "Bowtie2 tool" to generate the read count profile. Transcripts having log₂ (fold change) value ≥ 1 and ≤ -1 were considered to be upregulated and downregulated, respectively. Moreover, transcripts showing significant variation in fold change expression (corrected *P* value ≤ 0.05) in these sets were also identified. The overall transcriptome assembly and annotation procedure, as well as DGE analysis performed in this study, have been graphically represented in Supplementary Figure S1 and S2.

A total of approx. 46.9 million and 47.7 million raw paired-end reads were generated from Illumina NextSeq 500 platform for MI0 and MI10 samples, respectively. The raw paired-end sequences data in FASTQ format was deposited in the National Centre for Biotechnology Information's (NCBI) Short Read Archive (SRA) database under the accession number SRA426960. Raw reads were subjected to quality control using FastQC and the results showed that the average per sequence Phred quality score was above 30 in both the reads indicating high-quality sequencing run. Post quality filtering for low-quality regions, adapters and sequencing tags, a total read count of approx. 42.4 million for MI0 and 42.3 million for MI10 were withdrawn for

further processing. De novo assembly of Illumina NextSeq 500 processed data was performed using trinity at a hash length of 25, which generated 43,952 and 57,516 transcripts for MI0 and MI10, respectively (Table 2). A total of 11,756 and 12,524 transcripts with more than 1 kb in length as well as 25,982 and 30,709 transcripts with more than 500 bp in length were generated in MI0 and MI10 (Table 2). Higher N50 values (1159 and 986 for MI0 and MI10, respectively) also indicate the high quality of sequence assembly.

It is always challenging to predict accurate annotations for the transcripts from the non-model organism. In this study, representative transcripts (RTs) were annotated using NCBI BLAST 2.2.31 with the protein sequences of brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Transcripts greater than 30% identities were considered to be suitable to assign annotation based on high degree of sequence identity. GO annotation revealed that the annotated RTs represent various genes which are involved in various metabolic pathways (Fig. 1). In the molecular function (MF) category, the most frequently occurring terms were ATP binding (18.64%) and zinc ion binding (8.12%) followed by DNA binding (6.12%). Ubiquitin-dependent protein catabolic process (1.60%) and translation (1.59%) were the most frequently occurring terms in biological processes (BP) category followed by transmembrane transport (1.52%). The most frequently occurring terms in cellular component (CC) category was integral component of the membrane (11.56%) and nucleus (6.02%) followed by membrane (3.31%) (Fig. 1a). In control condition (MI10), the most frequently occurring terms under MF category were found also ATP binding (18.53%) followed by zinc ion binding (7.06%) and metal ion binding (5.20%). Translation (3.31%), followed by protein folding (1.94%) and intracellular protein transport (1.57%) were found to be the most represented terms under BP category. The most

Table 2 De novo assembly summary of sample MI0 and MI10 using Trinity tool

Samples	MI0	MI10
Tool used	Trinity	
Hash/k-mer length	25	
Transcripts/isotigs(contigs) generated	43,952	57,516
Maximum transcript/isotig length	10,538 bp	10,627
Minimum transcript/isotig length	301 bp	301 bp
Average transcript/isotig length	869.4 bp	784.3 bp
Median transcript/isotig length	2329 bp	441.5 bp
Total transcript length	38,210,788 bp	45,109,937 bp
Transcripts ≥ 500 bp	25,982	30,709
Transcripts > 1 kb	11,756	12,524
Transcripts > 10 kb	2	1
N50 value	1159	986

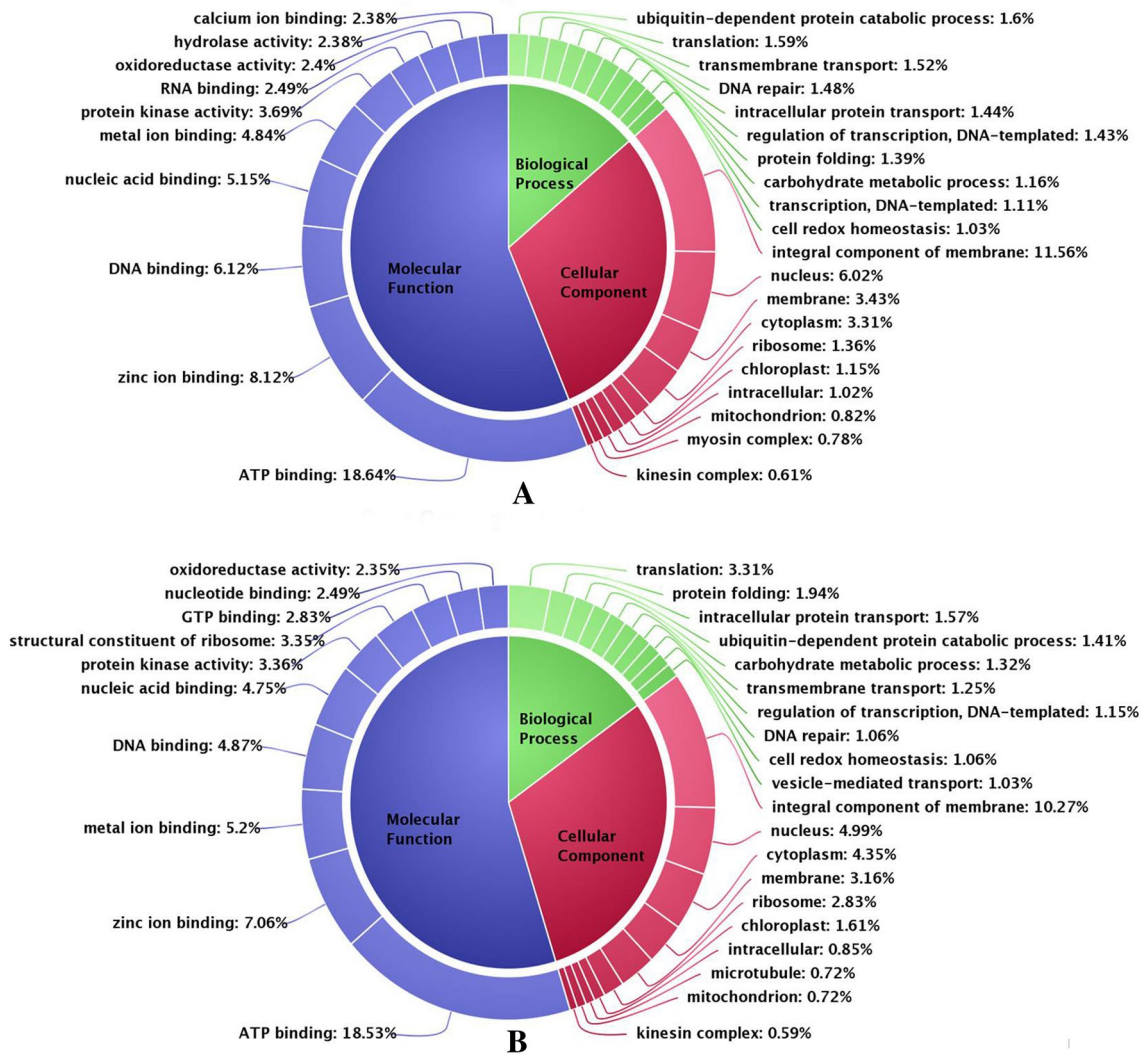


Fig. 1 Gene ontology (GO) analysis. **a** MI0, **b** MI10

frequently occurring terms in CC category were also integral component of membrane (10.27%) and nucleus (4.99%) followed by cytoplasm (4.35%) (Fig. 1b).

Differential gene expression (DGE) analysis

In the transcriptomic analysis, the differentially expressed genes between MI0 and MI10 were estimated by clusters or hierarchical groupings considering q value < 0.05 , $FDR \leq 0.05$ and minimum twofold change ($\log 2 \geq +1$ or ≤ -1). A total of 9519 unigenes expressed differentially between MI0 and MI10 among which 271 upregulated and 264 downregulated genes are significantly altered. To find out the possible molecular mechanisms involved in the stress responses, we manually classified and examined several genes that exhibited major significant changes in the stress conditions (MI0) compared to the MI10 control

(Table 3). Many of these genes altered were related to the synthesis of chaperone proteins (molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily), electron transport (Rieske (2Fe-2S), essential components in physiological processes including enzymes for carbon fixation (fructose-bisphosphate aldolase, glycine dehydrogenase), alginate and cellulose synthesis (mannuronan C-5-epimerase, UDP glucose 6-dehydrogenase), amino acid metabolism (shikimate kinase), transmembrane transport systems (aquaporins), genes involved in nitrogen fixation (glutamine synthetase), processes related to photosynthesis (light-harvesting complex protein), classical pathways to stress (vanadium-dependent bromoperoxidase), aprataxin synthesis (FHA-HIT protein), fatty acid metabolism (lipoxygenase), oxidative stress (alkaline phosphatase, HSPs, glutathione S-transferase), phytohormone biosynthesis (S-adenosylmethionine synthase, gibberellin

Table 3 List of some significantly altered genes in MI0 as compared to MI10 in *M. integrifolia* during abiotic stress response

Gene/protein name	Regulation	Fold change	<i>p</i> value	Function
Vanadium-dependent bromoperoxidase	UP in MI0	6.8914	0.0222098808	Antioxidant defenses
Urease accessory protein UreF	UP in MI0	22.4184	0.0317399721	Urea cycle
Glutathione <i>S</i> -transferase (EC 2.5.1.18)	UP in MI0	9.5782	0.0096688523	Glutathione synthesis and antioxidant defenses
Light harvesting complex protein	UP in MI0	16.4412	0.0017643654	Photosynthesis
Rieske (2Fe-2S) region	UP in MI0	39.0188	0.0003381751	Photosystem 2, electron transport, light sensing and carotenoid synthesis
Aquaporin	UP in MI0	30.4891	0.0091832762	Transportation system (activation of water and ion transporters)
Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	UP in MI0	12.3671	0.0040478809	Response to heat and oxidative stress (desiccation). Synthesis of chaperones
Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit	UP in MI0	6.2733	0.0350976028	Branched-chain amino acids
Serine/threonine-protein kinase CTR1	UP in MI0	11.8631	0.0415284001	Branched-chain amino acids, antioxidant defenses
Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	UP in MI0	11.1982	0.0075979684	Branched-chain amino acids, antioxidant defenses
Similar to ubiquitin specific protease 34	UP in MI0	18.3831	0.0151442253	Recycling proteins
Similar to ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	UP in MI0	6.5190	0.0458993508	Energy metabolism
Monophenol monooxygenase	UP in MI0	27.0267	0.000428844	Betalaina biosynthesis
Alkaline phosphatase	UP in MI0	19.2381	0.0022184014	Pathway: NAD/NADH phosphorylation and dephosphorylation(responses to oxidative stress)
Oxidoreductase (arsenate reductase, glutaredoxin)	UP in MI0	10.3163	0.0069709376	Arsenate detoxification
DNA helicase (EC 3.6.4.12)	UP in MI0	2.6621	0.0090710198	DNA helicases, utilize the energy from ATP hydrolysis
5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate–homocysteine <i>S</i> -methyltransferase	UP in MI0	12.4255	0.0092518168	Methionine metabolism, seleno compound metabolism, L-methionine biosynthesis
DEAD box helicase (EC 3.6.4.13)	UP in MI0	9.9354	0.0363002914	A nucleoside triphosphate + H ₂ O = a nucleoside diphosphate + phosphate catalytic mechanism
Lactoylglutathione lyase, putative	UP in MI0	9.8005	0.0141131854	Pyruvate metabolism, methylglyoxal degradation I
Ubiquitin-conjugating enzyme, putative	UP in MI0	5.5672	0.04170213	Protein ubiquitylation pathway
Ankyrin 3.6.1.15 (NTPase)	UP in MI0	7.3078	0.02370033	Oxidative phosphorylation
Gamma-glutamyl transpeptidase (EC 2.3.2.2)	UP in MI0	8.8739	0.03232579	Glutathione metabolism
Monogalactosyldiacylglycerol synthase, family GT28 (EC 2.4.1.46)	UP in MI0	6.9442	0.03697278	Galactolipid biosynthesis I
Serine/threonine dehydratase (EC 4.3.1.-) L-serine ammonia-lyase	UP in MI0	6.4735	0.02875467	Serine metabolism, threonine metabolism
Patatin(EC. 3.1.1.4)	UP in MI0	8.9673	0.04265161	Phospholipase metabolism
Acetoacetate–CoA ligase (EC 6.2.1.16)	UP in MI0	6.7772	0.04515125	Valine and leucine degradation
Carbohydrate kinase 2.7.1.14	UP in MI0	5.6828	0.04656553	Aerobic respiration I–III
Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial (DHOdehase) (EC 1.3.5.2)	UP in MI0	5.3654	0.04693179	Pyrimidine metabolism
Lipoxygenase	UP in MI0	18.02	0.001319908	Fatty acid metabolism and antioxidant defenses
ABC transporter-like	DOWN in MI0	0.1472	0.03404662	Cell signaling
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1/ NADH dehydrogenase (Ubiquinone) (EC 1.6.5.3)	DOWN in MI0	0.0026	1.40E–07	Aerobic respiration I–III
Shikimate kinase	DOWN in MI0	0.1832	0.04200643	Aromatic amino acids
Udp- <i>n</i> -acetylglucosamine pyrophosphorylase	DOWN in MI0	0.0557	0.00209323	Energy metabolism
Galactose-4-epimerase, UDP	DOWN in MI0	0.932	0.00831223	UDP-D-galactose biosynthesis

Table 3 (continued)

Gene/protein name	Regulation	Fold change	<i>p</i> value	Function
Long-chain acyl-CoA synthetase	DOWN in MI0	0.1441	0.02197075	Energy metabolism
Casein kinase II alpha subunit	DOWN in MI0	0.0813	0.02875841	Branched-chain amino acids
Magnesium chelatase subunit H, putative chloroplast (EC 6.6.1.1)	DOWN in MI0	0.0006	4.834E−09	Chlorophyll metabolism
Mannose-6-phosphate isomerase	DOWN in MI0	0.0463	0.0170957	L-ascorbate biosynthesis I (L-galactose pathway) Smirnoff wheeler pathway
Transposase	ONLY in MI0		0.01483208	Replicative transposition mechanism
FHA-HIT protein	ONLY in MI0		0.00128322	Aprataxin synthesis
Gibberellin 2-beta-dioxygenase	ONLY in MI0		0.004783	Diterpenoid biosynthesis; gibberellin inactivation I
Isocitrate lyase	ONLY in MI0		1.63E−06	Gluconeogenesis
Polymorphic Outer membrane protein G/I family	ONLY in MI0		5.38E−06	Components of the membrane
Polymorphic outer membrane protein	ONLY in MI0		1.2758E−05	Components of the membrane
Light harvesting complex protein	ONLY in MI0		0.02008396	Photosynthesis
NAD(P)H-nitrate reductase (EC 1.7.1.1)	ONLY in MI10		8.64E−07	Nitrogen assimilation
Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	ONLY in MI10		2.328782E−10	Photorespiration and carbon availability
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	ONLY in MI10		0.00097953	Branched-chain amino acids
Pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1)	ONLY in MI10		0.00083066	Branched-chain amino acids
Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	ONLY in MI10		0.00013577	Pyruvate metabolism. Branched chain amino acids
Serine hydroxymethyltransferase	ONLY in MI10		0.03295779	Photorespiration and carbon availability
S-adenosylmethionine synthase	ONLY in MI10		0.00431818	Ethylene synthesis
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ONLY in MI10		1.1215E−05	Pathway: glycolysis IV (plant cytosol)
Triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ONLY in MI10		8.47E−11	Gluconeogenesis. Photosynthesis
Aldehyde dehydrogenase	ONLY in MI10		2.9078E−05	Glycolysis/gluconeogenesis
Fructose-bisphosphate aldolase	ONLY in MI10		5.89E−10	Glycolysis/gluconeogenesis
L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase	ONLY in MI10		0.02630423	L-Ascorbate biosynthesis I (L-galactose pathway) Smirnoff-wheeler pathway
Formaldehyde dehydrogenase (EC 1.1.1.284)	ONLY in MI10		0.00160783	Methane metabolism, formaldehyde oxidation
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit) (EC 4.1.1.39)	ONLY in MI10		0.00013577	Involved in the first step of the calvin cycle for fixing carbon in photosynthetic systems, photorespiration

2-beta-dioxygenase), ascorbate biosynthesis (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase) and other processes (Table 3).

This is the first global transcriptome analysis of brown algae *Macrocystis integrifolia* (Phaeophyceae) under marine intertidal conditions. This study could be an important resource for subsequent genomic studies in brown algae to identify functional genes involved in different metabolic processes related to stress tolerance.

Data accessibility

The raw paired-end sequences data in FASTQ format was deposited in the National Centre for Biotechnology Information's (NCBI) Short Read Archive (SRA) database under the accession number SRA426960.

Acknowledgements This work was supported by the Grant no 352-PNIPC-PIBA-2014 from Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (INNOVATE PERU), Ministry of Production of Peru. Erika Salavarría was funded by scholarship program "Academia 2010". SENESCYT. Ecuador. We acknowledge Peruvian Seaweeds S.R.L. and Gunter Villena for logistic facilitated for the sampling. We acknowledge Genotypic Technology Pvt. Ltd Bengaluru, India for additional analysis. We want to thank Dr. Marcel Gutiérrez-Correa (RIP) for his extraordinary support and useful advice during the development of this work.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they don't have any conflict of interest.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alveal K (1995) Manejo de algas marinas. In: Alveal K, Ferrario M, Oliveira E, Sar E (eds) *Manual de métodos ficológicos*. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, pp 825–863
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc/>
- Bixler HJ, Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J Appl Phycol* 23:321–335. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9529-3>
- Chapman AS, Stévant P, Larssen WE (2015) Food or fad? challenges and opportunities for including seaweeds in a Nordic diet. *Bot Mar* 58:423–433. <https://doi.org/10.1515/bot-2015-0044>
- Fleurence J (2016) *Seaweeds as food: seaweed in health and disease prevention*. Academic Press, Cambridge, pp 149–167
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M et al (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29:644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Hafting JT, Critchley AT, Cornish ML et al (2012) On-land cultivation of functional seaweed products for human usage. *J Appl Phycol* 24:385–392. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9720-1>
- Jensen A (1993) Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia* 260–261:15–23. <https://doi.org/10.1007/BF00048998>
- Kupper FC, Carpenter LJ, McFiggans GB et al (2008) Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proc Natl Acad Sci* 105:6954–6958. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709959105>
- Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- López-Cristoffanini C, Tellier F, Otaíza R et al (2013) Tolerance to air exposure: A feature driving the latitudinal distribution of two sibling kelp species. *Bot Mar* 56:431–440. <https://doi.org/10.1515/bot-2013-0042>
- McHugh DJ (2003) *A Guide to the Seaweed Industry*. FAO Fisheries Technical Paper. ISBN 92-5-104958-0
- Synnytsya A, Copiková J, Kim WJ, Park YI (2015) Cell wall polysaccharides of marine algae. *Springer handbook of marine biotechnology*. Springer, Berlin, pp 543–590
- Tønnesen HH, Karlsen J (2002) Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 28:621–630. <https://doi.org/10.1081/DDC-120003853>
- Vo TS, Ngo DH, Kim SK (2012) Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. *Process Biochem* 47:386–394