



**Universidad
de Concepción**



**Expresión de genes en algas costeras antárticas
asociada a la respuesta al estrés ambiental en un
contexto de Cambio Climático**

Nombre: Catalina Gutiérrez Campos



 Universidad de
Playa Ancha

Agradecimientos



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	7
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:	14
HIPÓTESIS:	14
OBJETIVO GENERAL:	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. SITIO DE ESTUDIO, TOMA DE MUESTRAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	15
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LOS TRATAMIENTO (DEGs) Y Y DISEÑO DE PARTIDORES15	
3. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNC	18
4. PCR CONVENCIONAL Y PCR CUANTITATIVA (QPCR)	19
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	20
RESULTADOS	21
1. RESULTADOS EXTRACCIONES DE ARN	31
2. RESULTADOS RNASEQ	21
3. RESULTADOS QPCR	38
DISCUSIÓN	42
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. PARTIDORES DESARROLLADOS PARA <i>A. UTRICULARIS</i> PARA LAS PRUEBAS DE QPCR. LOS VALORES DE LOG(2)FC INDICAN EL FOLD CHANGE DONDE LOS VALORES $-1 <$ REPRESENTAN LOS GENES QUE SE INHIBEN Y LOS VALOR >1 SE REFIEREN A LOS GENES QUE SE SOBREENPRESAN.	16
TABLA 2. PARTIDORES DESARROLLADOS PARA <i>P. ENDIVIAFOLIA</i> PARA LAS PRUEBAS DE PARTIDORES. LOS VALORES DE LOG(2)FC INDICAN EL FOLD CHANGE DONDE LOS VALORES $-1 <$ REPRESENTAN LOS GENES QUE SE INHIBEN Y LOS VALOR >1 SE REFIEREN A LOS GENES QUE SE SOBREENPRESAN.	17

FIGURA 1. NÚMERO DE GENES QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE (DEGS). COLOR AZUL = GENES DE SOBREENPRESIÓN; COLOR NARANJO= GENES DE INHIBICIÓN; COLOR GRIS= GENES SIN CAMBIOS. DEGS DE (A) <i>A. UTRICULARIS</i> Y (B) <i>P. ENDIVIFOLIA</i>	21
FIGURA 2. ESQUEMA DEL NÚMERO DE GENES POR CATEGORÍA FUNCIONAL, INHIBIDOS EN LA MACROALGA <i>A. UTRICULARIS</i>	22
FIGURA 3. ESQUEMA DEL NÚMERO DE GENES POR CATEGORÍA FUNCIONAL, SOBREENPRESADOS EN LA MACROALGA <i>A. UTRICULARIS</i>	23
FIGURA 4. ESQUEMA DEL NÚMERO DE GENES POR CATEGORÍA FUNCIONAL, INHIBIDOS EN LA MACROALGA <i>P. ENDIVIFOLIA</i>	24
FIGURA 5. ESQUEMA DEL NÚMERO DE GENES POR CATEGORÍA FUNCIONAL, SOBREENPRESADOS EN LA MACROALGA <i>P. ENDIVIFOLIA</i>	24
LAS TABLAS 4, 5, 6, Y 7, MUESTRAN EN DETALLE LOS GENES MÁS REPRESENTATIVOS DEL TRANSCRIPTOMA DE <i>A. UTRICULARIS</i> Y <i>P. ENDIVIFOLIA</i>	24
TABLA 4. GENES EXPRESADOS MÁS REPRESENTATIVOS DEL TRANSCRIPTOMA DE <i>A. UTRICULARIS</i> SELECCIONADOS POR PRESENTAR LOS MAYORES VALORES DE LOG(2) DEL FOLD CHANGE.	25
TABLA 3. EXTRACCIONES DE ARN PARA LAS MUESTRAS DE PRUEBA DE <i>P. ENDIVIFOLIA</i> Y <i>A. UTRICULARIS</i> CON DOS KIT DE EXTRACCIÓN: E.Z.N.A. OMEGA Y FAVORGEN.....	31
TABLA 4. RESULTADOS DE LAS EXTRACCIONES DE ARN DE LAS MUESTRAS CONTROL (2°C) Y TRATAMIENTO (8 °C). CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO. RAZÓN 260/280 MUESTRA LA PUREZA DEL ARN.	32
FIGURA 6. PRIMERAS EXTRACCIONES DE PRUEBA EN GEL DE AGAROSA AL 1% CON KIT DE EXTRACCIÓN E.Z.N.A. CONDICIONES DE ELECTROFORESIS 100 VOLTS POR 40 MINUTOS.	34
TABLA 5. VERIFICACIÓN DE LA PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN DE LAS MUESTRAS REPRESENTADAS EN LA FIGURA 1. DE ELECTROFORESIS.	34
FIGURA 7. PRUEBA DE PARTIDORES DE <i>P. ENDIVIFOLIA</i> POR PCR CONVENCIONAL. CONDICIONES ELECTROFORESIS: GEL DE AGAROSA AL 1,5%, POR 40 MIN A 100 VOLTS. EN AMARILLO LOS PARTIDORES QUE AMPLIFICARON.....	35
FIGURA 8. PRUEBA DE PARTIDORES DE <i>A. UTRICULARIS</i> POR PCR CONVENCIONAL. CONDICIONES ELECTROFORESIS: GEL DE AGAROSA AL 1,5%, POR 40 MINUTOS A 100 VOLTS. EN AMARILLO LOS PARTIDORES QUE AMPLIFICARON.....	35

FIGURA 9. PRUEBA DE PARTIDORES POR PCR CONVENCIONAL DE <i>A. UTRICULARIS</i> Y <i>P. ENDIVIIFOLIA</i> SELECCIONADOS PARA QPCR. CONDICIONES ELECTROFORESIS: GEL DE AGAROSA AL 1,5 % POR 40 MINUTOS A 100 VOLTS.....	36
FIGURA 10. VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA DE <i>P. ENDIVIIFOLIA</i> Y <i>A. UTRICULARIS</i> PARA MUESTRAS DEL TRATAMIENTO (8 °C) Y CONTROL (2 °C). GEL DE AGAROSA AL 1%.	36
FIGURA 11. VISUALIZACIÓN DE PCR CONVENCIONAL PARA EL GEN HOUSEKEEPING 18S DE <i>A. UTRICULARIS</i> Y <i>P. ENDIVIIFOLIA</i> , EN GEL DE AGAROSA AL 1%.	37
TABLA 6. COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LA CUANTIFICACIÓN DE ARN POR ESPECTROFOTÓMETRO: [RNA] 1 Y CUANTIFICACIÓN POR FLUORESCENCIA: [RNA] 2.	37
FIGURA 12. CAMBIO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES (A) PCP Y (B) LHCS ENTRE UNA CONDICIÓN CONTROL A 2 °C Y UN TRATAMIENTO A 8 °C OBTENIDOS POR QPCR Y/O POR RNASEQ EN <i>A. UTRICULARIS</i> . LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LA BARRA ROJA CON ASTERISCO INDICA QUE HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL CONTROL Y EL TRATAMIENTO	39
FIGURA 13. CAMBIO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES (A) VMT, (B) HSP70_1, (C) SOD Y (D) HSP70_3 ENTRE UNA CONDICIÓN CONTROL A 2 °C Y UN TRATAMIENTO A 8 °C OBTENIDOS POR QPCR Y/O POR RNASEQ EN <i>P. ENDIVIIFOLIA</i> . LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LA BARRA ROJA CON ASTERISCO INDICA QUE HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL CONTROL Y EL TRATAMIENTO.	41

RESUMEN

Antártica es el continente más sensible al cambio global, donde las tendencias de la temperatura de la superficie han mostrado un alza significativa. La IPCC pronostica un aumento de la TSM hasta 5,55 °C en los escenarios más pesimistas. La temperatura modula el desarrollo, supervivencia, distribución y abundancia de especies. En particular, las macrófitas costeras pueden verse afectadas por los cambios en su ambiente. En esta investigación se analizó el transcriptoma de dos algas antárticas: *Pyropia endiviifolia* y *Adenocystis utricularis*, sometidas a condiciones de estrés por temperatura a 2 °C como control y 8 °C de tratamiento por 5 días. Los resultados mostraron una alta sobreexpresión de genes en *A. utricularis*, donde algunas familias de genes representadas en esta categoría pertenecen a la familia de las Heat shock proteins, genes relacionados con el estrés oxidativo, factores de transcripción y genes ribosomales. Por otro lado, en *P. endiviifolia* hubo una alta inhibición de genes, algunos de ellos relacionados con el estrés oxidativo, heat shock protein, y genes de respuesta al estrés abiótico. De los genes que se sobreexpresaron en *P. endiviifolia* hubo Hsp y algunos genes relacionados con traducción y transporte. Además, también se observó en *A. utricularis* que los genes relacionados a la fotosíntesis se inhibieron bajo el tratamiento con calor. En cuanto a la verificación por qPCR, los genes LHCS y PCP de *A. utricularis* verificados por qPCR se condicen con lo obtenido del RNAseq. Para *P. endiviifolia*, los resultados de los genes VMT y Hsp70_1 no se condicen con lo obtenido del RNAseq. En conclusión, los resultados de los análisis transcriptómicos sugieren que el *A. utricularis* pueda responder de forma más eficiente a los cambios en su ambiente que *P. endiviifolia* bajo un escenario de altas temperaturas.

ABSTRACT

Antarctica is the continent most sensitive to global change, where surface temperature trends have shown a significant rise. The IPCC predicts an increase in the SST up to 5.55 °C in the most pessimistic scenarios.

Temperature modulates the development, survival, distribution and abundance of species. In particular, coastal macrophytes can be affected by changes in their environment. In this research, the transcriptome of two Antarctic algae was analyzed: *Pyropia endiviifolia* and *Adenocystis utricularis*, subjected to temperature stress conditions at 2 °C as a control and 8 °C as a treatment for 5 days. The results showed a high gene overexpression in *A. utricularis*, where some gene families represented in this category belong to the Heat shock protein family, genes related to oxidative stress, transcription factors and ribosomal genes. On the other hand, in *P. endiviifolia* there was a high inhibition of genes, some of them related to oxidative stress, heat shock protein, and abiotic stress response genes. Of the genes that were overexpressed in *P. endiviifolia* were Hsp and some genes related to translation and transport. Furthermore, it was also observed in *A. utricularis* that genes related to photosynthesis were inhibited under heat treatment. Regarding verification by qPCR, the LHCS and PCP genes of *A. utricularis* verified by qPCR are consistent with those obtained from RNAseq. For *P. endiviifolia*, the results of the VMT and Hsp70_1 genes do not agree with those obtained from RNAseq. In conclusion, the results of the transcriptomic analyzes suggest that *A. utricularis* can respond more efficiently to changes in its environment than *P. endiviifolia* under a high temperature scenario.

INTRODUCCIÓN

Antártica, continente polar ubicado en la zona sur del planeta, se divide en 3 zonas, las cuales fueron determinadas de acuerdo a la geografía del continente, que son la Antártica occidental, Antártica oriental y la península Antártica (Convey *et al.*, 2009). Esta última área es la más sensible al cambio global, donde las tendencias de la temperatura de la superficie han mostrado un alza significativa (Steig *et al.*, 2009). La parte occidental y norte de la Península Antártica, presentan las mayores tendencias de ascenso en las temperaturas, con énfasis en las estaciones de verano y otoño (Convey *et al.*, 2009). Se considera que la península Antártica presenta una de las tasas más rápidas de cambios en el clima, afectando no solo a la temperatura de la superficie, sino también a la temperatura del océano, la cual va en aumento debido a un declive del hielo marino (Convey *et al.*, 2009; Mulvaney, 2012). Las predicciones para 2050 serán el continuo derretimiento del hielo marino y glaciares, en consecuencia, el seguido aumento de las temperaturas tanto de la superficie terrestre como la del mar (Tuckett *et al.*, 2019). El calentamiento del océano no es algo reciente, se reporta que desde el año 1980, ya la temperatura del mar comenzó a ir en ascenso y, en promedio, las temperaturas globales de la superficie del mar han aumentado aproximadamente en 0,8 °C (Teoh *et al.*, 2010). Ahora, mientras las emisiones de gases de efecto invernadero se mantengan, el comportamiento de la temperatura irá cada vez más en aumento. Se espera que, a finales del siglo XXI, la temperatura de la superficie del mar (TSM) aumente a 2 °C (Teoh *et al.*, 2010; Aral & Guan, 2016) y, por otro lado, el reporte de la IPCC (panel intergubernamental en cambio climático, 2018) pronostica un aumento de la TSM hasta 5,55 °C en los escenarios más pesimistas.

La temperatura modula el desarrollo, supervivencia, distribución y abundancia de especies (Teoh *et al.*, 2010). En un contexto de cambio global, las variaciones del clima pueden generar estrés debido a las oscilaciones térmicas (Müller *et al.*, 2012; Celis-Plá *et al.*, 2020). En particular, los organismos fotoautótrofos, al estar expuestos a temperaturas por sobre su rango óptimo, puede generar estrés

oxidativo, donde se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y, como consecuencia, esto puede afectar las macromoléculas e inhibir el crecimiento y desarrollo (Sáez *et al.*, 2015). Para contrarrestar las ROS se activan mecanismos como el ciclo del glutatión-ascorbato, y también proteínas como por ejemplo el ascorbato peroxidasa (APX) que se encarga de reducir el peróxido de hidrógeno en agua (Celis-Plá *et al.*, 2020; Rodríguez-Rojas *et al.*, 2020). Por otro lado, las altas temperaturas no solo conducen hacia estrés oxidativo, sino que también a la denaturación de las proteínas, y en ese sentido, se comienzan a producir unas proteínas llamadas proteínas de shock térmico (del inglés Hsp: Heat Shock Protein), que son un tipo de chaperonas encargadas de la reparación y/o replegamiento de las proteínas dañadas (Sharkey & Schrader, 2006; Barati *et al.*, 2019; Celis-Plá *et al.*, 2020). Algunos ejemplos de estas proteínas son la familia de las Hsp100, la cual se ha descrito que está directamente relacionada con la termo-tolerancia, es decir, los organismos que las posean, tendrán la capacidad de adaptarse frente a situaciones de estrés por calor (Agarwal *et al.*, 2002; Sharkey & Schrader, 2006). También las pequeñas Hsp o smhsp (del inglés “small heat shock protein”), otra familia de Hsp que se encuentran tanto en orgánulos de la célula como en el citosol y se encargan de la regulación de los procesos metabólicos que ocurren en la célula bajo estrés por temperatura, cómo por ejemplo en el cloroplasto el mecanismo es la protección del fotosistema II (PSII) y (Wang & Luthe, 2003; Sharkey & Schrader, 2006) así otras smHsp con distintos roles dependiendo del compartimento de la célula en que se encuentren (Sharkey & Schrader, 2006).

Las macrófitas costeras, cómo productores primarios, dan soporte a las redes tróficas. Es por eso, que los impactos del cambio climático, no solamente afectan a estos organismos por sí solos, sino que además compromete el estado del resto de las especies de la comunidad (Wiencke *et al.*, 2007; Sáez *et al.*, 2015). Las macroalgas (rojas, pardas y verdes), se distribuyen en las zonas intermareales y submareales de las aguas costeras. Desempeñan un papel importante en el ciclo del carbono costero (Israel *et al.*, 2010). Las algas pardas de la Clase Phaeophyceae, derivan su color debido a que poseen pigmento carotenoides como

la fucoxantina. Son dominantes en regiones de aguas más frías, particularmente en el ártico. Es considerable mencionar que en su ciclo de vida la reproducción dominante es vegetativa (Lee, 2008) y, en ese sentido, sería relevante saber que pasaría con las especies de algas pardas ya que la reproducción vegetativa llevaría a menor variabilidad genética. Entonces, surge la pregunta de si este grupo es capaz de presentar adaptabilidad frente a cambio en su ambiente frente a un contexto de cambio global. Por otro lado, las algas rojas o Rhodophytas, son las más abundantes en el ecosistema marino, pero no son las dominantes en los polos (Lee, 2008). Es crucial conocer cómo el cambio climático ha ido generando impactos en las macroalgas, ya que, en ambientes polares, se ven expuestas a condiciones únicas de cambios de temperatura y en este escenario de cambio global es importante saber qué rangos de temperatura soportan.

Para el caso de las Rhodophytas en general se reporta que aquellas de ambientes polares pueden tolerar temperaturas de hasta 22 °C (Gómez & Huovinen, 2020). Sin embargo, en etapa de crecimiento dependen de temperaturas mucho más bajas, ya que crecen a 0 °C (Wiencke & Amsler, 2012). En macroalgas antárticas de la isla Rey Jorge, Celis-Plá *et al.*, (2020) postulan que no existe una clara tendencia de que es lo que ocurre a nivel fisiológico bajo condiciones de estrés por temperatura, y que para el caso de *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg 1907 se observan indicios de estrés oxidativo por debajo de 8 °C, respecto de las otras especies de algas estudiadas; *Monostroma hariotti* (Gain, 1911) y *Pyropia endiviifolia* (Gepp & Gepp) Choi & Hwang, 2011 que sí presentan rangos de tolerancia térmica. Para las macroalgas, se ha descrito que el ciclo glutatión-ascorbato es uno de los principales mecanismos que utilizan para contrarrestar las ROS, y en ese sentido, en el mismo estudio, encontraron que, en las tres especies, *A. utricularis*, *P. endiviifolia* y *M. hariotii*, los niveles de compuestos antioxidantes eran suficientes para hacer frente a la condición de estrés (Celis-Plá *et al.*, 2020; Rodríguez-Rojas *et al.*, 2020). En cuanto a lo que ocurre a nivel transcripcional, únicamente se reporta en *P. endiviifolia* que hay una regulación positiva de las HSP (Celis-Plá *et al.*, 2020).

En este contexto de crisis climática, el estrés abiótico puede limitar la sobrevivencia de los organismos fotosintéticos (Wahid *et al.*, 2012). Para enfrentar esta situación, deben desarrollar estrategias para poder aclimatarse a esta nueva condición ambiental. Para una comprensión más detallada de los mecanismos que actúan en la tolerancia al estrés abiótico, la transcriptómica es la herramienta más certera para responder a estas incógnitas, ya que permite identificar los elementos y/o mecanismos funcionales bajo cierta condición fisiológica (Wei *et al.*, 2011; Im *et al.*, 2015). Hay varias investigaciones en que se ha estudiado las respuestas a nivel transcriptómico bajo condiciones de estrés por alta temperatura, como por ejemplo en un trabajo por Yan *et al.*, 2016, trabajaron con la variedad “isla” de espinaca que es tolerante al frío y sensible al calor, para poder revelar que ocurre al exponerse a altas temperaturas, bajo condiciones de laboratorio sometieron muestras a 35 °C y con un control a 24 °C por 5 horas. Algunas de las categorías que se regularon al alza fueron “respuesta al estímulo abiótico”, “respuesta al calor”, “transporte de membrana”, “proceso metabólico de carbohidratos”, “transcripción”, “proceso metabólico de fosfolípidos” y genes regulados a la baja (inhibición) fueron de las categorías de “estabilización de proteínas”, “transporte de electrones”, “fotosistema II” “proteínas de membrana”, con estos resultados, como respuesta general se obtuvo que varios mecanismos relacionados con el estrés actuaron frente a la condición de alta temperatura y, que la fotosíntesis se notó afectada en su funcionamiento normal, quedando inhibida. Más específicamente, el trabajo de Yan *et al.*, 2016 indicó al menos unos treinta y tres genes que pertenecen a la familia de las Hsp, incluidas las smallHsps, Hsp100, Hsp90, Hsp70 y Hsp60 chaperonas que se indicaron como protagonistas en la respuesta al estrés por calor, plegando, activando y degradando proteínas, y también actuando bajo la condición control. También hubo factores de transcripción que se regularon al alza, como por ejemplo los de la familia HSF (“heat shock factor”), también la familia de las WRKY y las MYB, que se regularon hacia el alza y también se inhibieron. En *Arabidopsis*, se ha descrito también la presencia de señales de Calcio, donde por ejemplo la calmodulina se ha descrito con un rol importante en la activación de factores de transcripción como el WRKY y los HSF en condiciones de estrés (Zhang *et al.*, 2009;

Li *et al.*, 2010). En *Colobanthus quitensis*, una angiosperma Antártica, estudiaron el transcriptoma en condiciones de campo, en este caso de estudio los genes con expresión hacia el alza incluían a factores de transcripción, proteínas con dedos de zinc, proteínas de unión a calcio, ligasas, entre otras (Mi Cho *et al.*, 2018).

En algas, hay registros en algas del género *Pyropia*, dos en particular con interés comercial. En *P. seriata*, se trabajó en condiciones de laboratorio con un control a 10 °C y tratamiento a 25 °C. Aquí, la Hsp70 se destacó regulándose al alza, además se le atribuye un rol en el mantenimiento de la homeostasis en la célula. Por otro lado, reportan que encontraron muchos genes que no presentan homologías con otros genes de otras especies en respuesta a estrés abiótico. Muchos genes del transcriptoma de *P. seriata* se presentaron como hipotéticos y/o sin nombre (Im *et al.*, 2014). En *P. yezoensis*, también se evaluaron las respuestas del alga bajo estrés por temperatura, en este caso con tres tratamientos (24 °C, 0 °C y -8 °C) y un control (8 °C), encontraron que las respuestas a las temperaturas de - 8°C, 0 °C y 8 °C fueron similares y, que hubo una diferencia marcada frente al tratamiento de alta temperatura (24 °C). Los genes que aumentaron su respuesta en el tratamiento de 24 °C fueron de replicación, reparación del ADN y genes de procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (Sun *et al.*, 2015).

Finalmente, aún faltan más antecedentes para poder generar respuestas de que ocurrirá en un contexto de cambio global cuando la temperatura del mar aumente a lo más 5,55°C. En síntesis, para comprender de mejor manera cuáles serían los aspectos que van a cambiar en las macroalgas frente a cambios en la temperatura de la superficie del mar, es necesario conocer que proteínas están actuando a temperaturas determinadas, cuáles son las familias de Hsp dominantes, o si están actuando moléculas antioxidantes y/o proteínas, si hay factores de transcripción, conocer si las respuestas de las plantas son las mismas que las algas. Por esto, en este estudio, se evaluó, a nivel transcriptómico, las respuestas de dos macroalgas costeras de Antártica en isla Rey Jorge: *P. endiviifolia* especie endémica y, *A. utricularis*, bajo estrés por temperatura, proyectándose en un escenario de cambio

climático en el 2100, donde se espera que la temperatura aumente en 6 °C con respecto a los niveles preindustriales.

Preguntas de Investigación:

¿Qué cambios ocurren a nivel transcripcional en *A. utricularis* y *P. endiviifolia* en respuesta a un aumento de temperatura?

Hipótesis:

El estrés por calor desencadena la expresión diferencial de genes involucrados en la termo-tolerancia en algas antárticas.

Objetivo General: Evaluar las respuestas a nivel transcripcional global en macroalgas antárticas frente a estrés por temperatura y validar esta respuesta por técnicas de biología molecular clásica.

Objetivos específicos:

1. Analizar los transcriptomas de *A. utricularis* y *P. endiviifolia* en respuesta a un aumento de 6 °C a través de un RNA seq.
2. Seleccionar los genes de las macroalgas *A. utricularis* y *P. endiviifolia*, en respuesta a un aumento de 6 °C para el diseño de los partidores.
3. Validar los genes que se inhiben y se sobreexpresan en las especies *A. utricularis* y *P. endiviifolia* del RNAseq mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sitio de estudio, toma de muestras y diseño experimental.

En la Bahía de Fildes, Isla Rey Jorge, Península Antártica (62°02'00"S; 58°21'00"W) se colectaron tres especies de algas: *A. utricularis* (Phylum Ochrophyta, Clase Phaeophyceae) y *P. endiviifolia* (Phylum Rhodophyta, Clase Compsopogonophyceae). Luego las muestras, se colocaron en contenedores plásticos con agua de mar filtrada de 1 μm a 2 °C bajo aireación constante para la aclimatación en laboratorio por dos días. Posteriormente, las muestras se sometieron a un estrés por temperatura por cinco días, considerando dos réplicas biológicas por especie. El control se mantuvo a 2 °C, mientras que la condición experimental se expuso a una temperatura de 8 °C. El fotoperíodo fue de 20 horas de luz (día) y 4 horas de oscuridad (noche), lo que equivale al ciclo natural en el verano austral en el mes de enero y, las condiciones de luz diurna fue de 140 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintética activa (PAR). Las muestras para los análisis de RNA seq se tomaron a los 5 días. Todas las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y luego fueron conservadas a -80 °C para los posteriores análisis moleculares. Para determinar los genes que se expresaban diferencialmente luego de la exposición de las muestras a estos tratamientos se realizó un análisis de RNAseq con los correspondientes análisis bioinformáticos.

2. Identificación de los genes expresados diferencialmente en los tratamientos (DEGs) y diseño de partidores

De acuerdo a los resultados del RNAseq (transcriptoma) obtenidos anteriormente por la empresa china BGI, se diseñaron 14 pares de partidores para cada una de las especies, para 7 genes que se sobreexpresan y 7 que se subexpresan con el fin de poder hacer la validación mediante PCR cuantitativa (sigla en inglés, qPCR). La identificación se realizó mediante un análisis diferencial de expresión DESeq2 con el software R version 4.0.4. (R Core Team, 2013), donde los criterios de selección serán sobreexpresión igual a $\text{Log}(2)\text{FC} > 1$ e inhibición igual a $\text{Log}(2)\text{FC} < -1$, considerando un valor p ajustados $< 0,05$. Los partidores para los análisis de RT-

qPCR se diseñaron a partir de las secuencias en formato FASTA de los DEGs seleccionados utilizando la herramienta bioinformática de GenScript (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>). Dentro de los genes identificados, de manera preferencial, los genes que se estudiarán por qPCR corresponden a genes que codifican para proteínas relacionadas con el estrés por calor, como las HSP y las relacionadas con el ciclo del glutatió-ascorbato, de acuerdo a los antecedentes analizados. En las Tablas 1 y 2 se observan los partidores que se escogieron para diseñar y utilizar en la verificación de qPCR.

Tabla 1. Partidores desarrollados para *A. utricularis* para las pruebas de qPCR. Los valores de Log(2)FC indican el Fold Change donde los valores $-1 <$ representan los genes que se inhiben y los valor >1 se refieren a los genes que se sobreexpresan.

<i>A. utricularis</i>			
Gen	Proteína	Secuencia 5'-3'	Log(2)FC RNAseq
<i>ADK4</i>	Adenylate kinase 4	CGCCCTGATCCGGCGTGGAC GCGCTGCCGTGGCTGCAAAG	-7,85
<i>60SRP</i>	60S ribosomal protein L15	GGTGGCGTCCTGGGCAACCC AGGCCCGACAAGGCCAGGAGA	-4,96
<i>FXC</i>	Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein F	CCGCCAGTCGACCGCATGT AACGGGCGTGCCGCACAGAT	-3,06
<i>LRR</i>	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	GGGCGGCTGAGCCAGCTGAA CGCAGCCGACACGCCACCTT	-2,85
<i>LHCS</i>	Light-harvesting complex stress-related protein 1	CGATCGGATGCATGGTGCGGACA CAACACACCGCCTGCGAGGGA	-2,28
<i>CAO</i>	Copper amine oxidase	GCCGGCCACCTCTCGGCATC CCCGCCGGCAATGCCTTCCA	-2,18
<i>DTN</i>	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	ACCTTGCTGCTGCACGACCGA GGGAGGGAACGCGGGCTGTG	-1,48
<i>TUA</i>	Tubulin alpha chain	AGCCCTGACCCAGTGCCTCCT ACGCCTCGGTCAAGTGCACATCG	7,36
		CGGCACCGGGAGCGACCATC	

<i>HTP</i>	hydrogen-translocating pyrophosphatase activity	CGCCATTGGCTCTGCCGTCT	5,4
<i>ABP</i>	Actin-binding protein F	CGGCCAGAACTGCTGCTGCCA TCCCAGCTCCGGGCAAGTTCCA	5,27
<i>CYP</i>	Cysteine proteinase	CGACCTAGGCTCCCACCCACCA AGCCCTTCTCGTACCTGCGGTT	4,33
<i>PCP</i>	Probable cysteine protease	CCGCTGATGGAATGCCACCGA GGCTGGGCTTTGGAAGGGTCCAC	3,72
<i>ADH</i>	Putative aldehyde dehydrogenase	CCCTCTTGGGCGCGGGTGTC TCATCCGCTGCCCGCGCTTC	3,5
<i>EFA</i>	Elongation factor 1-alpha	CCCGCCAAGGGTTGCGAGACT GTCACGGACGGCGAAACGTCCA	2,84

Tabla 2. Partidores desarrollados para *P. endiviifolia* para las pruebas de partidores. Los valores de Log(2)FC indican el Fold Change donde los valores $-1 <$ representan los genes que se inhiben y los valor >1 se refieren a los genes que se sobreexpresan.

<i>P.endiviifolia</i>			
Gen	Proteína	Secuencia 5'-3'	Log(2)FC RNAseq
<i>VMT</i>	vesicle-mediated transport	CGCAAGCGGGTACGCCACGA CAGGCCATCACCGGCTGCGT	9,38
<i>MAT</i>	methionine adenosyltransferase activity	TGCGAGACCGCCGCAAGAC TGGGTGGCGAGGAGGTGGGT	8,76
<i>MAPK</i>	MAP kinase activity	GCTCAGGCGCCCGGTACCAC CGCTTCGATGCGGGCTGGGT	6,06
<i>XXT</i>	xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	CCATACCGCACCGCCTGCCA CCGCTGGGCGCCTTTACCGA	3,67
<i>SEL1</i>	Sel1-like repeats.	CTGCAGCGCCGACAGGTGGT GTGGGTGCTGCGGCAGGTGA	2,4
<i>vWF</i>	von Willebrand factor (vWF) type A domain	TCAATCGCGGCGAGCGCCTT CACGAGCCGTCCTGCGCTGT	2,12

<i>CBP</i>	Chlorophyll A-B binding protein	TGCCAGCCGCCATTGGGACA GCCGGCCGAACCCGTCTCTG	1,69
<i>COLL</i>	collagen	CGGCCCGTGCTAGGCTCCAG CCTCGCCACGCCTGCGACTC	-11,15
<i>HSP</i>	heat shock protein	GCGAGGATGGCGGCCTGGAC CCAATGCGAGCGCGCCAAGC	-9,23
<i>PC1</i>	Belongs to the peptidase C1 family	CCGTCGACGCCGAGACGCT ACCGGTGATCCGGATGCGAGTGT	-8,81
<i>GLT</i>	glutathione transferase activity	CGTCACGCGCTCGTCCTCGAA CCGCCTGGAAGGGCGGATGT	-7,68
<i>RPL16</i>	Ribosomal protein L16p/L10e	ACTGGCGTGCCACAGAAGACTGC CGGCGAGGCGCGCATTTGAG	-3,74
<i>PTP</i>	Plant transposon protein	CGTCGCTGGACCGCCACTGT GGGTGGCGGTGGTTGTGGCA	-3,28
<i>PPH</i>	phosphopyruvate hydratase activity	CGTCCACGCGCGCTCCATCT TTGGCGCCCAGGCGCTTCTT	-2,34

3. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se tomaron 100 mg de cada muestra de algas para moler en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo. Luego, para la extracción de ARN se usó el mini kit FavorPrep Plant Total RNA Purification (Favorgen, Biotech Corp, Taiwan), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pureza del ARN se evaluó mediante la razón 260/280 con equipo de espectrofotometría Spectro Nano Star. Se colocaron 2 µL de muestra en una microplaca L-Vis Plate incorporada en el lector del equipo de espectrofotometría, donde además se observó la cuantificación aproximada del RNA. Para verificar la integridad del ARN, además se evaluó mediante electroforesis con gel al 1% de agarosa empleando el método de “bleach-gel” (Aranda *et al.*, 2012), utilizando el fluoróforo SYBR safe de Invitrogen de Thermo Fisher Scientifics como agente intercalante para visualizar el ARN en el gel. Luego, se seleccionaron las muestras con purezas entre [1,81 -2,1] y concentraciones de RNA sobre >50 ng/ µL para llevar a cabo la cuantificación específica mediante fluorescencia utilizando el kit Quant-iT RiboGreen RNA Assay (Invitrogen, USA) y el fluorímetro QFX Fluorometer (DeNovix, USA). Finalmente,

con el kit “High capacity cDNA reserve transcription kit” de appliedbiosystems se sintetizó el ADN complementario (ADNc) utilizando 400 ng de ARN para *A. utricularis* y 500 ng de ARN para *P. endiviifolia*, donde de acuerdo a las instrucciones del kit se requiere entre 250 ng a 500 ng.

4. PCR convencional y PCR cuantitativa (qPCR)

Primero, se verificó si los primers amplificaban mediante PCR convencional utilizando el GoTaq® Green Master Mix (Promega), donde de acuerdo las instrucciones del kit se debía usar por partidor 10 µL de Green Master Mix, 8 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de cDNA y 0,5 µL del partidor “forward” y 0,5 µL del partidor “reverse” completando un volumen final de 20 µL. Se probaron dos condiciones para el programa de PCR: (1)* denaturación inicial a 95° C por 5’; 30 ciclos de 95° C por 30”, 60 °C por 30” y 72 °C por 30 ”; y extensión final a 72° C por 10 ‘; (2)* denaturación inicial a 95° C por 5’; 35 ciclos de 95° C por 30”, 55 °C por 30” y 72 °C por 30 ”; y extensión final a 72° C por 10 ‘. Los productos de PCR en la primera prueba con el programa 1)* se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% por 30 min a 100 volts. Para el programa de PCR 2)* se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis por 45 min a 100 volts en gel de agarosa al 1,5%.

Posteriormente, se cuantificó la expresión de todos los genes, donde se evaluó los genes que se sub-expresan y los genes que se sobreexpresan, utilizando como gen de referencia el de ARNr 18S, el cual no presenta variaciones en su expresión (gen “House-keeping”).

Para el qPCR se usó 50 ng de cDNA con 0,25 µM de cada primer, más la mezcla de qPCR concentrado Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix 1 (Agilent Technologies) en 1x y agua libre de nucleasas completando un volumen final de 20 µL, donde se usó el siguiente programa de PCR: denaturación inicial 95 °C por 5’, 40 ciclos de 95 °C por 30”, 55 °C por 30”, 72 °C por 30”, y una extensión final a 72°C por 10’. Se usó el equipo quant studio para el análisis. La expresión relativa

de los genes se basó en el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando como gen de referencia (“housekeeping”) el 18S ARNr (Livak *et al.*, 2001).

5. Análisis estadísticos

Para analizar los datos se usó un test de Yuen (considerando que los datos no presentaban una distribución normal) para verificar si había diferencias significativas entre los resultados de la secuenciación masiva de RNA y su verificación por qPCR, con un $p < 0,05$. Los datos fueron analizados mediante la plataforma de R.

RESULTADOS

1. Resultados RNAseq

El transcriptoma de *A. utricularis* (Figura 7a) reveló un total de 673 genes que se expresan diferencialmente (DEG), de los cuales 411 mostraron cambio en su expresión hacia el alza, es decir, hubo alta expresión de estos. Solo 100 genes, se vieron inhibidos bajo la condición de estrés. Por otro lado, *P. endiviifolia* (Figura 7b) el número de genes de expresión fue 210 y, genes de inhibición 66.

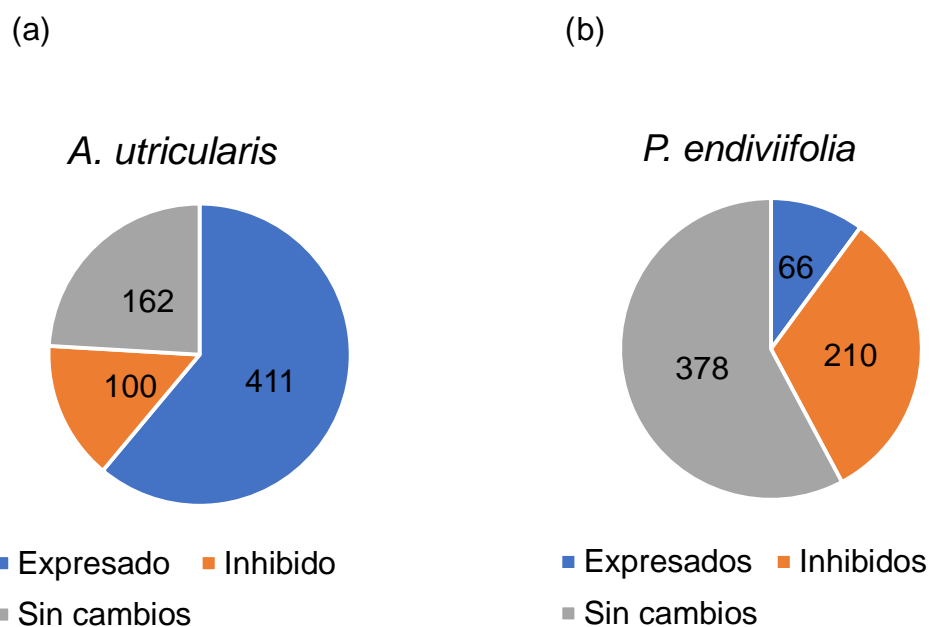


Figura 1. Número de genes que se expresan diferencialmente (DEGs). Color azul = genes de sobreexpresión; color naranja= genes de inhibición; color gris= genes sin cambios. DEGs de (a) *A. utricularis* y (b) *P. endiviifolia*.

En las Figuras 2 y 4 se muestra el número de genes inhibidos *A. utricularis* y *P. endiviifolia*, resumidos en sus respectivas categorías, los cuales se agruparon de acuerdo a su función o mecanismo al que pertenecen. En las Figuras 3 y 5, de la misma forma, se representan los genes expresados de *A. utricularis* y *P. endiviifolia*, los cuales se organizaron de la misma forma mencionada anteriormente. La

cantidad de genes representados mediante categorías funcionales de la Figura 2 son: quinasas (3), estrés oxidativo (3), estrés (4), replicación (7), fotosíntesis (8), transcripción (8), traducción (13), transporte (19) y otros (33), esta última categoría representa los genes que eran únicos en su categoría y/o no estaban descritos, eran genes desconocidos, sin una función clara.

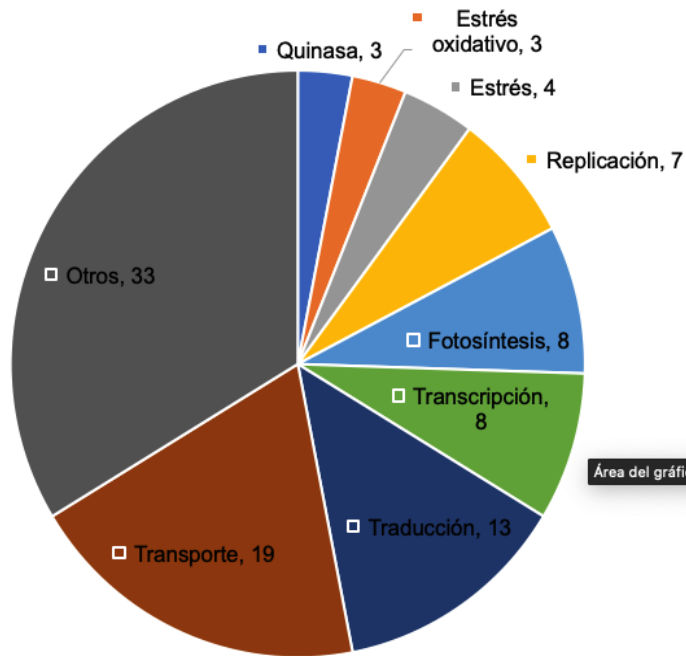


Figura 2. Esquema del número de genes por categoría funcional, inhibidos en la macroalga *A. utricularis*.

El número de genes representados mediante categorías funcionales de la Figura 3 son: fotosíntesis (3), unión a Calcio (3), metabolismo de glúcidos (4), endopeptidasas (5), proteasas (6), replicación (6), transferasas (7), transcripción (19), transporte (54), quinasas (40), estrés y estrés oxidativo (52), traducción (83) y otros (129).

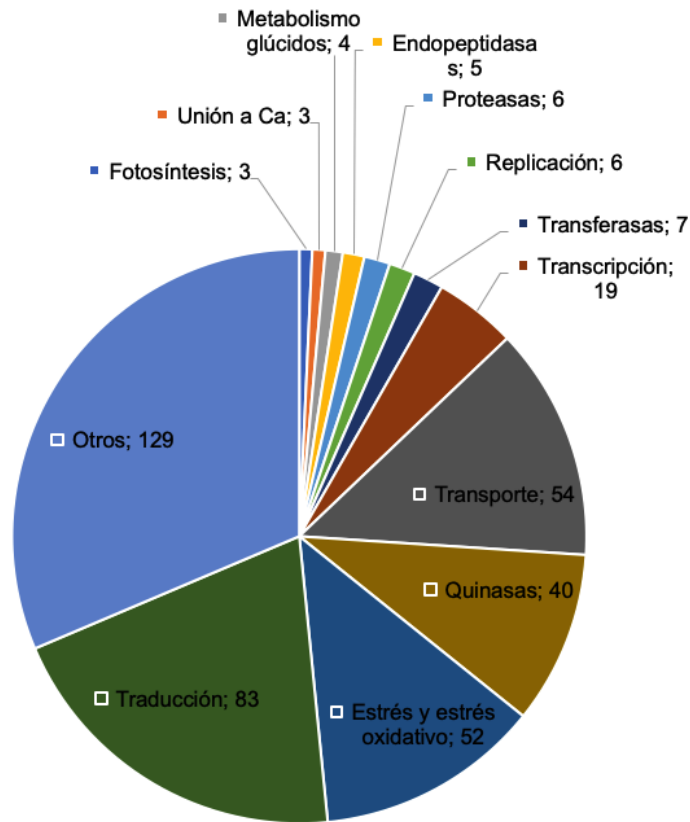


Figura 3. Esquema del número de genes por categoría funcional, sobreexpresados en la macroalga *A. utricularis*.

El resultado de los genes representados mediante categorías funcionales de la Figura 4 fue: metabolismo de glúcidos (6), peptidasas (5), replicación (5), quinasas (7), ciclo de calvin (8), endopeptidasas (8), oxidorreductasas (8), ciclo de krebs (9), estrés (14), transporte (30) y otros (79).

El resultado para los genes del la Figura 5 fue el siguiente: Replicación (2), fotosíntesis (3), deshidrogenasas (5), estrés (5), dominio proteico (7), traducción (10), transporte (13) y otros (21).

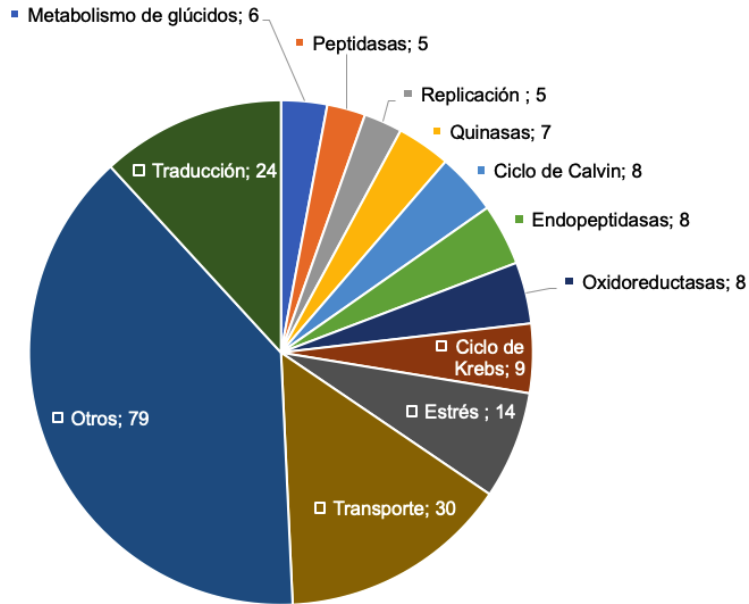


Figura 4. Esquema del número de genes por categoría funcional, inhibidos en la macroalga *P. endiviifolia*.

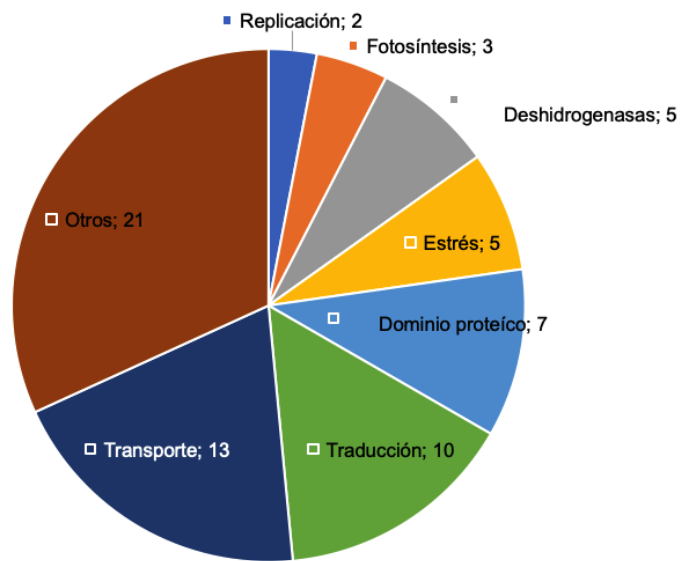


Figura 5. Esquema del número de genes por categoría funcional, sobreexpresados en la macroalga *P. endiviifolia*.

Las tablas 4, 5, 6, y 7, muestran en detalle los genes más representativos del transcriptoma de *A. utricularis* y *P. endiviifolia*.

Tabla 4. Genes expresados más representativos del transcriptoma de *A. utricularis* seleccionados por presentar los mayores valores de Log(2) del Fold Change.

Categoría	Gen	Descripción	Log(2) Fold Change
Traducción	RPL4A	60S ribosomal protein L4-1	6,78
Estrés	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	6,74
Estrés	Hsp70	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	6,49
Proteasas	ADL1	Calpain-type cysteine protease ADL1	6,45
Estrés	Dsc1	DSC E3 ubiquitin ligase complex subunit 1	5,61
Traducción	RPS26A	40S ribosomal protein S26-1	5,40
Transporte	hppA	Putative K(+)-stimulated pyrophosphate-energized sodium pump	5,40
Transporte	LSI2	Silicon efflux transporter LSI2	5,25
Estrés	DSPTP1	Dual specificity protein phosphatase 1	4,71
Quinasas	MAPK	Dual specificity mitogen-activated protein kinase	4,66
Transporte	ATP5F1B	ATP synthase subunit beta	4,55
Traducción	PRP8A	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8A	4,42
Traducción	eIF3	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	4,38
Transcripción	MYB3R-2	Transcription factor MYB3R-2	4,24
Transporte	At1g30560	Putative glycerol-3-phosphate transporter 3	4,21
Transporte	NHX2	Sodium/hydrogen exchanger 2	4,14

Traducción	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha	4,10
Estrés	Hsp90	Heat shock protein 90-1	3,96
Fotosíntesis	-	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	3,95

Tabla 5. Genes inhibidos más representativos de *A. utricularis* seleccionados por presentar los mayores valores de Log(2) del Fold Change.

Categoría	Gen	Descripción	Log(2) Fold Change
Quinasa	ADK-B	Adenylate kinase 4	-7,85
Traducción	rpl-15	60S ribosomal protein L35-3	-4,96
otros	NXC24_	Probable zinc-ribbon domain	-4,35
Estrés	PPP5C	protein serine/threonine phosphatase activity	-3,95
Transporte	SPAC&G10.03c	probable cardiolipin-specific deacylase, mitochondrial	-3,41
Transporte	MS1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	-3,27
Fotosíntesis		Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein F, chloroplastic (Fragment)	-3,06

	FCPF		
Quinasa	LRR	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA	-2,85
Fotosíntesis	FCPA	Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein A, chloroplastic	-2,50
Transporte	TIM9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	-2,39
transporte	CAX3	Vacuolar cation/proton exchanger	-2,37
Fotosíntesis	LHCS	Light-harvesting complex stress-related protein 1, chloroplastic	-2,28
Transporte	At4g27745	Protein yippee-like At4g27745	-2,20
Estrés	Cao1	Copper amine oxidase 1	-2,18
Transporte	DGAT2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	-2,16
Estrés	TPP1	Probable trehalose-phosphate phosphatase 1	-2,16
transporte	ANTR6	Probable anion transporter 6, chloroplastic	-2,02
Transporte	Sec61	Protein transport protein Sec61 subunit gamma	-1,84
Estrés oxidativo	lolG	Myo-inositol 2-dehydrogenase	-1,71

Tabla 6. Genes expresados más representativos de *P. endiviifolia* seleccionados por presentar los mayores valores de Log(2) del Fold Change.

Categoría	Gen	Descripción	Log(2) Fold Change
Transporte	AFUB_100140	vesicle-mediated transport	9,38
Deshidrogenasas	Esi_056_0011	Glucose / Sorbosone dehydrogenase	8,94
Transporte	MAT	methionine adenosyltransferase activity	8,76
Traducción	-	translation elongation factor activity	8,68
Transporte	TIF3F1	eukaryotic translation initiation factor	7,74
Traducción	rplM	Belongs to the universal ribosomal protein uL13 family	7,53
Transporte	MRS2	Inner membrane magnesium transporter MRS2	7,53
Traducción		ribosomal small subunit assembly	7,52
Estrés	MAPK1	MAP kinase activity	6,06
Transporte	At1g14720	xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	3,67
Traducción	-	rRNA binding	2,84

Traducción	RPL	60s ribosomal protein	2,71
Transporte	-	Proton-conducting membrane transporter	2,55
Traducción	-	Sel1-like repeats.	2,40
Transporte	-	Phosphate acyltransferases	2,30
Estrés	Hsp	Heat shock	2,20
Deshidrogenasas	GSS	Glucose / Sorbosone dehydrogenase	2,20

Tabla 7. Genes inhibidos más representativos de *P. endiviifolia* seleccionados por presentar los mayores valores de Log(2) del Fold Change.

Categoría	Gen	Descripción	Log(2) Fold Change
Estrés	Hsp	heat shock	-9,24
Oxidoreductasas	UA75_08495	Flavin containing amine oxidoreductase	-8,87
Peptidasas	TVAG_355480	Belongs to the peptidase C1 family	-8,81
Oxidoreductasas	-	intramolecular oxidoreductase activity, transposing S-S bonds	-8,45

Oxidoreductasas	-	COG1902 NADH flavin oxidoreductases, Old Yellow Enzyme family	-8,31
Ciclo de Calvin	gapA	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) (phosphorylating) activity	-8,00
Traducción	-	translation initiation factor activity	-7,83
Estrés	-	1-Cys peroxiredoxin	-7,80
Metabolismo de bases nitrogenadas	-	'de novo' CTP biosynthetic process	-7,72
Estrés	GSTF2	glutathione transferase activity	-7,68
Transporte	-	atpase alpha	-7,60
Estrés	Hsp70	Belongs to the heat shock protein 70 family	-7,54
Estrés	GST	glutathione transferase activity	-7,47
Ciclo de krebs	-	Malate/L-lactate dehydrogenase	-7,43
Estrés	CAM	calcium- and calmodulin- responsive	-7,28

		adenylate cyclase activity	
Traducción	-	translation elongation factor activity	-7,28
Metabolismo de bases nitrogenadas	-	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase activity	-7,15
Estrés	Hsp	heat shock protein binding	-7,00
Traducción	RPL16	Ribosomal protein L16p/L10e	-3,74

2. Resultados extracciones de ARN y pruebas de PCR convencional

Previo a las extracciones de ARN para los análisis por qPCR, se realizaron extracciones de prueba con el kit E.Z.N.A. OMEGA (Figura 6 y Tabla 5). Luego, se probó también el kit Favorgen (Tabla 3), para evaluar cómo resultaba la extracción con el alga *A. utricularis*, ya que con el kit E.Z.N.A. OMEGA dio baja concentración de ARN. Las muestras extraídas se cuantificaron mediante espectrofotometría y el criterio de selección de kit de extracción de ARN fue que en ambas algas diera una concentración de ARN >80 ng/ μ L y la pureza del ARN (razón 260/280) entre un rango de 1,81-2,1 (Tabla 3).

Tabla 3. Extracciones de ARN para las muestras de prueba de *P. endiviifolia* y *A. utricularis* con dos kit de extracción: E.Z.N.A. OMEGA y Favorgen.

Réplica	Especie	Razón 260/280	[RNA] ng/ μ L	Kit
P_I	<i>P. endiviifolia</i>	2,44	85,76	E.Z.N.A. OMEGA
P_II	<i>P. endiviifolia</i>	1,93	349,2	E.Z.N.A. OMEGA

P_III	<i>P. endiviifolia</i>	1,95	217,97	Favorgen
P_IV	<i>P. endiviifolia</i>	1,81	45,19	Favorgen
P_V	<i>P. endiviifolia</i>	1,94	84,96	Favorgen
A_I	<i>A. utricularis</i>	1,47	20,4	E.Z.N.A. OMEGA
A_II	<i>A. utricularis</i>	1,86	108,35	Favorgen
A_III	<i>A. utricularis</i>	1,83	33,24	Favorgen
A_IV	<i>A. utricularis</i>	1,89	37,44	Favorgen

Luego se realizaron las extracciones de ARN con las muestras control (2 °C) y tratamiento (8 °C) que se observan en la Tabla 4. Además, en color naranja se marcaron las muestras con pureza y concentraciones en los rangos mencionados en el párrafo anterior. Esto para posteriormente llevar a cabo la cuantificación por fluorescencia. Previo a la cuantificación final, se hizo una verificación de la integridad del ARN mediante electroforesis para las muestras del control y tratamiento, en la Figura 10 se observa que todas las muestras amplificaron, por lo tanto, se determinó que todas las extracciones fueron exitosas.

Tabla 4. Resultados de las extracciones de ARN de las muestras control (2°C) y tratamiento (8 °C). Cuantificación mediante espectrofotómetro. Razón 260/280 muestra la pureza del ARN.

Réplica	Especie	Tratamiento T°	Razón 260/280	[RNA] ng/ µL
A_1	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,78	93
A_2	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,81	45
A_3	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,65	50
A_4	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,75	45
A_5	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,75	32
A_6	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,82	58
A_7	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,81	70
A_8	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,76	80
A_9	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,84	58

A_10	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,81	100
A_11	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,79	142
A_12	<i>A. utricularis</i>	2 °C	1,8	128
A_13	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,81	57
A_14	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,88	65
A_15	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,8	38
A_16	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,66	37
A_17	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,78	88
A_18	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,73	101
A_19	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,73	115
A_20	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,78	82
A_21	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,85	187
A_22	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,88	146
A_23	<i>A. utricularis</i>	8 °C	1,83	157
P_1	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	1,87	80
P_2	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	1,9	72
P_3	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	1,82	112
P_4	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	1,86	44
P_5	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,83	150
P_6	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,91	57
P_7	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,84	68
P_8	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,89	95
P_9	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,97	207
P_10	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,97	279
P_11	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,98	350
P_12	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2	458
P_13	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2,01	575
P_14	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2	420
P_15	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,98	215
P_16	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2	487

P_17	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2	510
P_18	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2	565
P_19	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2	645
P_20	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	2	254
P_21	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	1,98	334

Por otro lado, con las muestras de ARN de prueba, se realizaron las verificaciones de los partidores, para esto se realizó PCR convencional y se visualizó por electroforesis. Se sintetizó cDNA y se probaron los partidores de *P. endiviifolia* (Figura 7), donde solo 2 de ellos amplificaron y fueron vistos en el gel de agarosa (en color amarillo se marcaron los partidores que funcionaron). El mismo procedimiento se hizo para los partidores de *A. utricularis* (Figura 8). En una tercera prueba (Figura 9), se corroboró que amplificaran todos los partidores que ya se habían probado que amplificaban en el gel de agarosa.

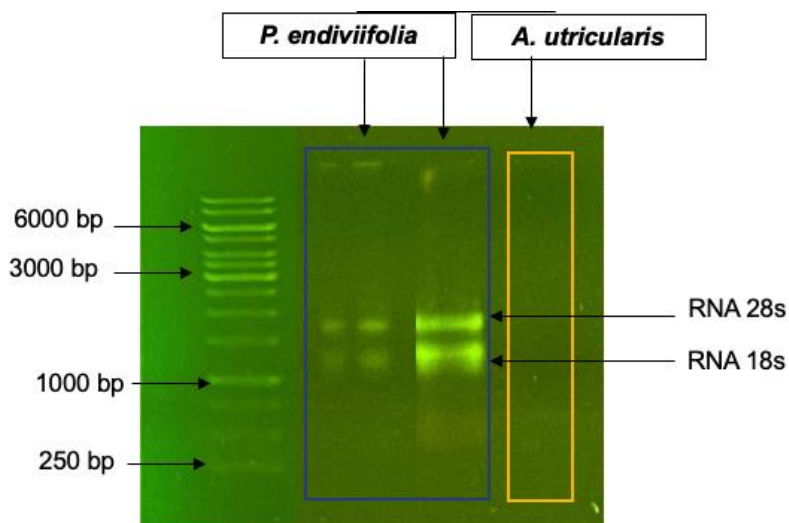


Figura 6. Primeras extracciones de prueba en gel de agarosa al 1% con kit de extracción E.Z.N.A. Condiciones de electroforesis 100 volts por 40 minutos.

Tabla 5. Verificación de la pureza y cuantificación del ARN de las muestras representadas en la Figura 1. de electroforesis.

Especie	260/280	[RNA] ng uL	KIT
<i>P. endiviifolia</i>	2,44	85,76	E.Z.N.A. OMEGA

<i>P. endiviifolia</i>	1,93	349,2	E.Z.N.A. OMEGA
<i>A. utricularis</i>	1,47	20,4	E.Z.N.A. OMEGA

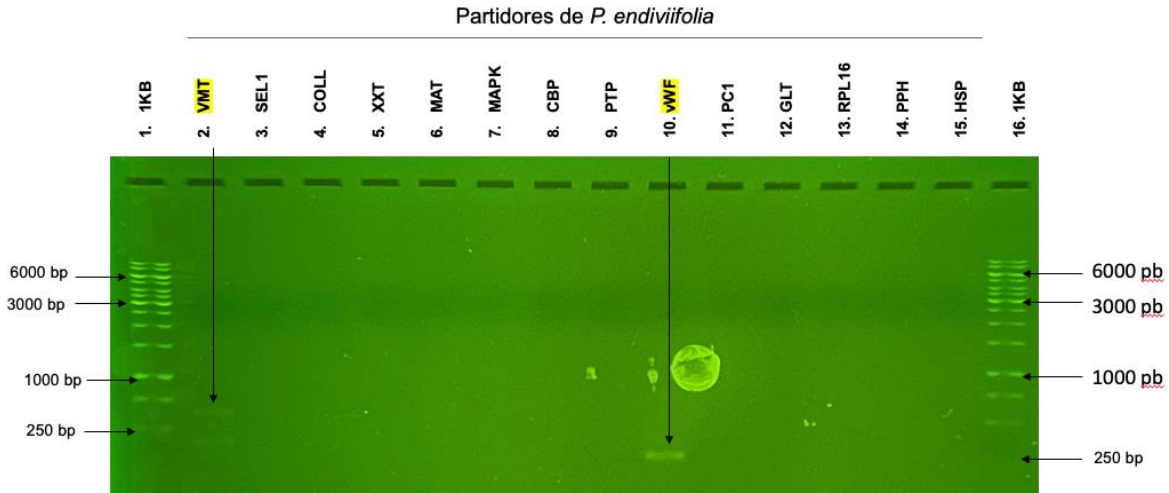


Figura 7. Prueba de partidores de *P. endiviifolia* por PCR convencional. Condiciones electroforesis: Gel de agarosa al 1,5%, por 40 min a 100 volts. En amarillo los partidores que amplificaron.

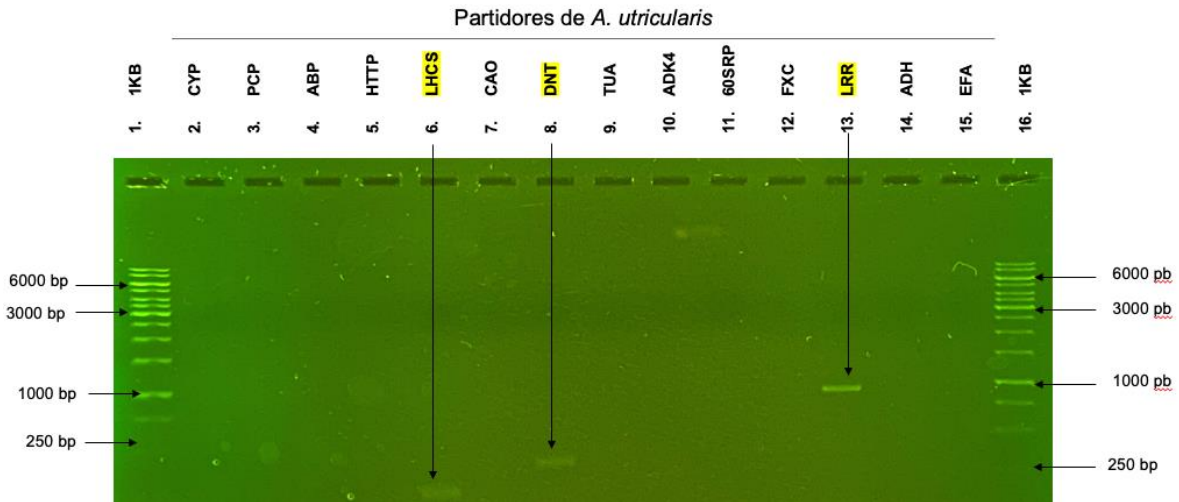


Figura 8. Prueba de partidores de *A. utricularis* por PCR convencional. Condiciones electroforesis: gel de agarosa al 1,5%, por 40 minutos a 100 volts. En amarillo los partidores que amplificaron.

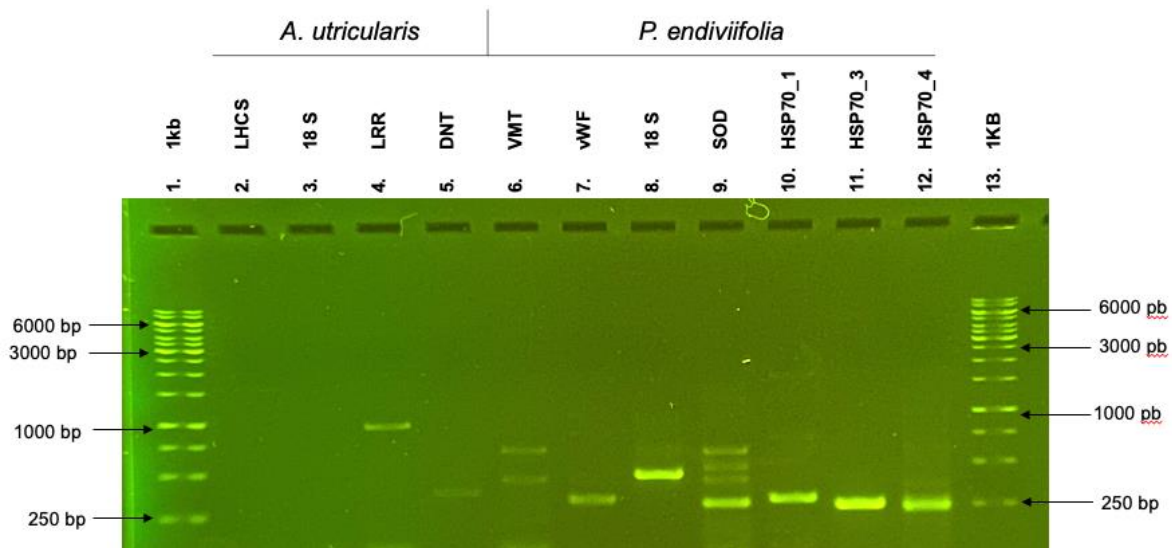


Figura 9. Prueba de partidores por PCR convencional de *A. utricularis* y *P. endiviifolia* seleccionados para qPCR. Condiciones electroforesis: gel de agarosa al 1,5 % por 40 minutos a 100 volts.

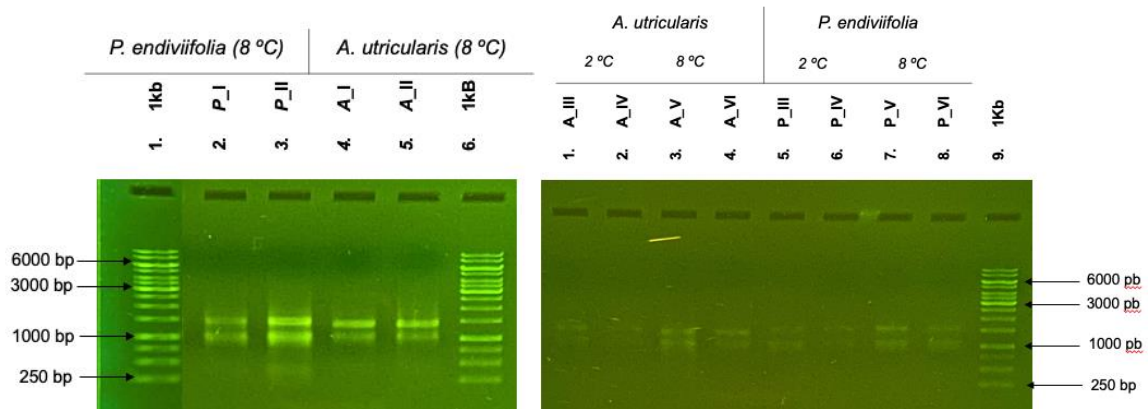


Figura 10. Verificación de la integridad del RNA de *P. endiviifolia* y *A. utricularis* para muestras del tratamiento (8 °C) y control (2 °C). Gel de agarosa al 1%.

Finalizando, luego de todas las pruebas tanto de verificación de partidores mediante PCR y de integridad de ARN, algunas de las muestras seleccionadas para cuantificar mediante fluorescencia, se usaron para realizar una PCR convencional y probarlas con el gen housekeeping 18 s de ambas macroalgas (Figura 11).

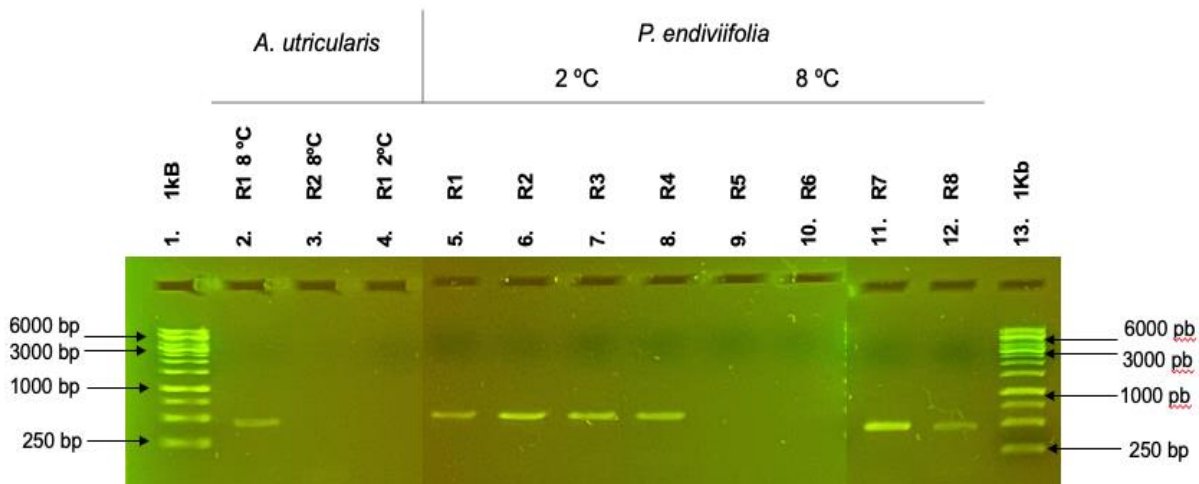


Figura 11. Visualización de PCR convencional para el gen housekeeping 18s de *A. utricularis* y *P. endiviifolia*, en gel de agarosa al 1%.

Por último, se realizó la cuantificación por fluorescencia (Tabla 6), donde en color naranja se marcaron las muestras que se utilizaron para sintetizar el cDNA que posteriormente se utilizó para hacer las verificaciones del RNAseq mediante la qPCR. El criterio de selección fue elegir al menos 3 muestras de cada tratamiento con concentraciones >50 ng.

Tabla 6. Comparación de los valores de la cuantificación de ARN por espectrofotómetro: [RNA] 1 y cuantificación por fluorescencia: [RNA] 2.

Réplica	Especie	T°	[RNA] 1 ng/ µL	[RNA] 2 ng/ µL
1	<i>A. utricularis</i>	2 °C	58	35,8
2	<i>A. utricularis</i>	2 °C	70	67,1
3	<i>A. utricularis</i>	2 °C	58	44,6
4	<i>A. utricularis</i>	8 °C	187	158,8
5	<i>A. utricularis</i>	8 °C	146	74,8
6	<i>A. utricularis</i>	2 °C	45	39,6
7	<i>A. utricularis</i>	8 °C	57	39,5
8	<i>A. utricularis</i>	8 °C	65	40,9

27	<i>A. utricularis</i>	8 °C	157	40,6
28	<i>A. utricularis</i>	2 °C	100	32,7
29	<i>A. utricularis</i>	2 °C	142	110
30	<i>A. utricularis</i>	2 °C	128	99,5
17	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	150	52,6
18	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	57	22,7
19	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	80	24,4
20	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	68	26,0
21	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	95	35,8
22	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	72	29,0
23	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	112	34,3
24	<i>P. endiviifolia</i>	2 °C	44	8,9
37	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	207	56,15
38	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	279	75,85
39	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	350	109,1
40	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	458	178
41	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	575	194,05
42	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	420	138,7
43	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	215	55,4
44	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	487	141,9
45	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	510	146,35
46	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	565	155,1
47	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	645	215,55
48	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	254	64,45
49	<i>P. endiviifolia</i>	8 °C	334	102,8

3. Resultados qPCR

Se analizó con el test de yuen, el qPCR de *A. utricularis* para verificar si existían diferencias significativas entre los resultados de las muestras del control (2 °C) y el tratamiento (8 °C). Con un $p > 0,05$, los resultados de los genes analizados fueron:

PCP fueron $p=0,022 < 0,05$ y LHCS, el valor de $p=4,641e-10 < 0,05$ lo cual indica que hay diferencias significativas entre el fold change del control y en tratamiento para ambos genes. Para la macrolaga *P. endiviifolia*, los resultados analizados arrojaron lo siguiente: SOD $p=0,163 > 0,05$ y VMT $p=0,06 > 0,05$, lo cual no indica diferencias significativas entre el control y el tratamiento de esos genes. Para los genes: Hsp70_3 $p=0,041$ y Hsp70_1 $p=0,005 > 0,05$, donde estos valores de p si representaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento.

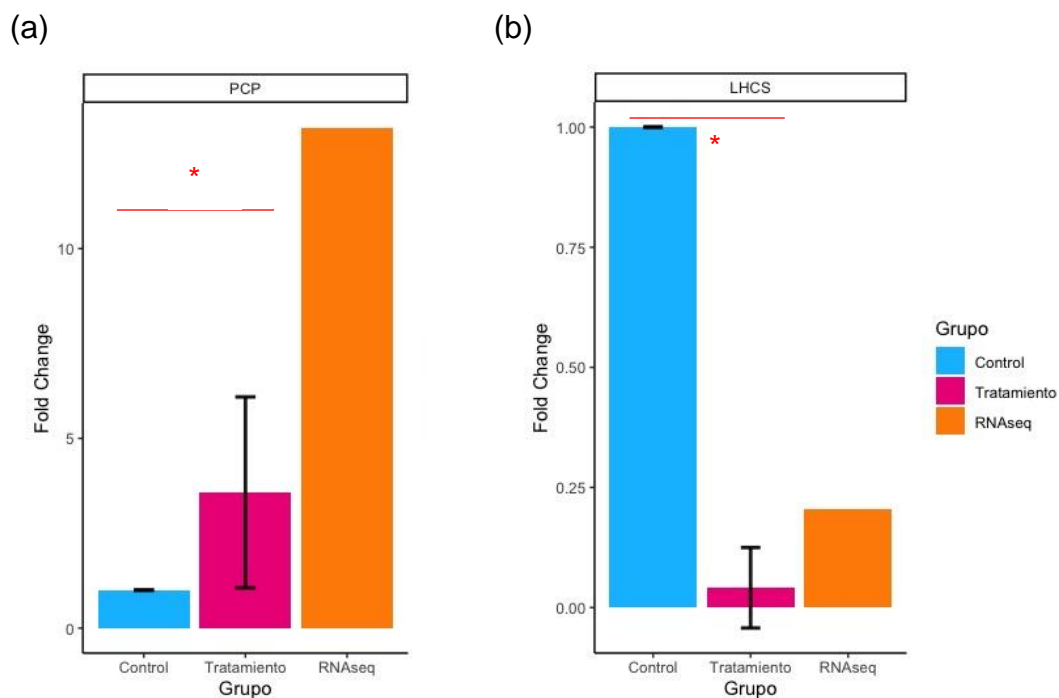
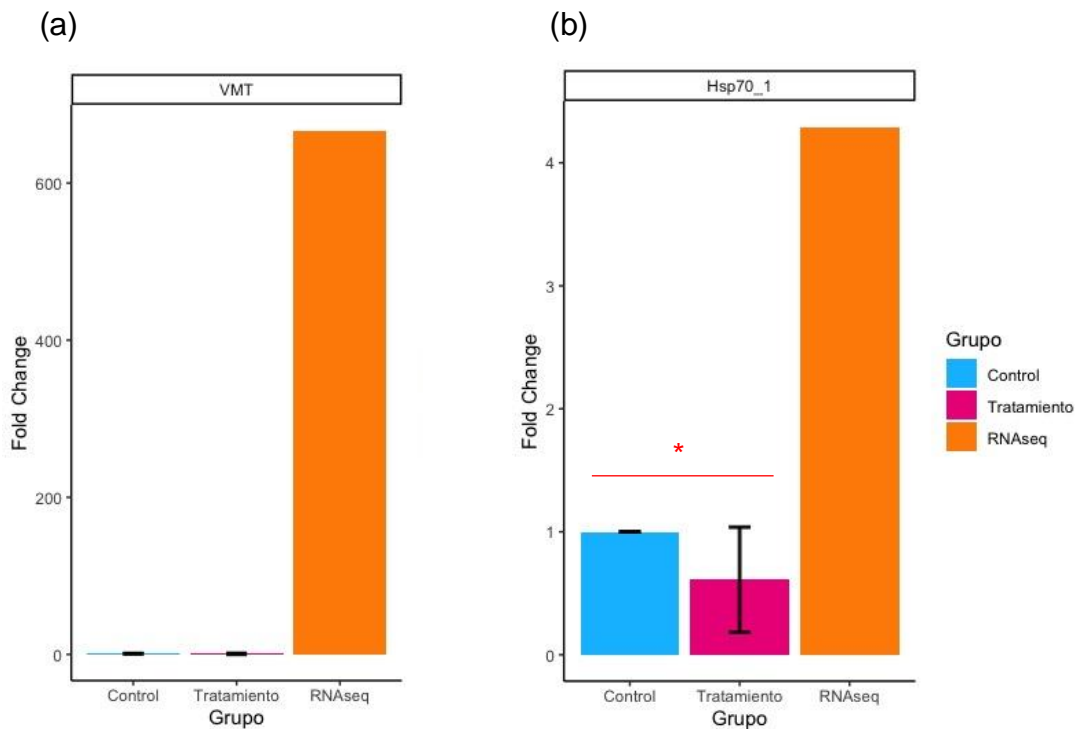


Figura 12. Cambio de expresión de los genes (a) PCP y (b) LHCS entre una condición control a 2 °C y un tratamiento a 8 °C obtenidos por qPCR y/o por RNaseq en *A. utricularis*. Las barras de error representan la desviación estándar. La barra roja con asterisco indica que hay diferencias significativas entre el control y el tratamiento

Previo a la verificación por PCR cuantitativa, se estandarizaron las condiciones de qPCR. Para eso se realizaron curvas de melting, donde se comprobó que genes que amplificaron en la PCR convencional, amplificarían mediante qPCR (Figuras 7, 8 y 9). . Como resultado, los genes que amplificaron y que se pudieron usar para

verificación del RNAseq fueron PCP y LHCS para *A. utricularis* (Figura 12a y b); VMT, SOD, Hsp70_1 y Hsp70_3 para *P. endiviifolia* (Figura 13 a, b, c y d).

En las Figura 12 y 13, el Fold Change indica la tasa de cambio en la expresión de genes y, para verificar si el Fold Change del qPCR para el tratamiento se condice con el Fold Change del RNAseq, ambos valores deben ser $1 < \text{ó} > 1$, se considera como línea base para comparar, el valor de fold change del control (fold change=1). El Fold Change para el gen PCP (Figura 12 a) del tratamiento y del RNAseq son mayores a 1, esto significa que hay sobreexpresión y que se condice el resultado de qPCR con el de RNAseq. Para el gen LHCS (Figura 12 b), el fold change de qPCR se condice con el fold change de RNAseq, en este caso hay una regulación de este gen a la baja, existe inhibición.



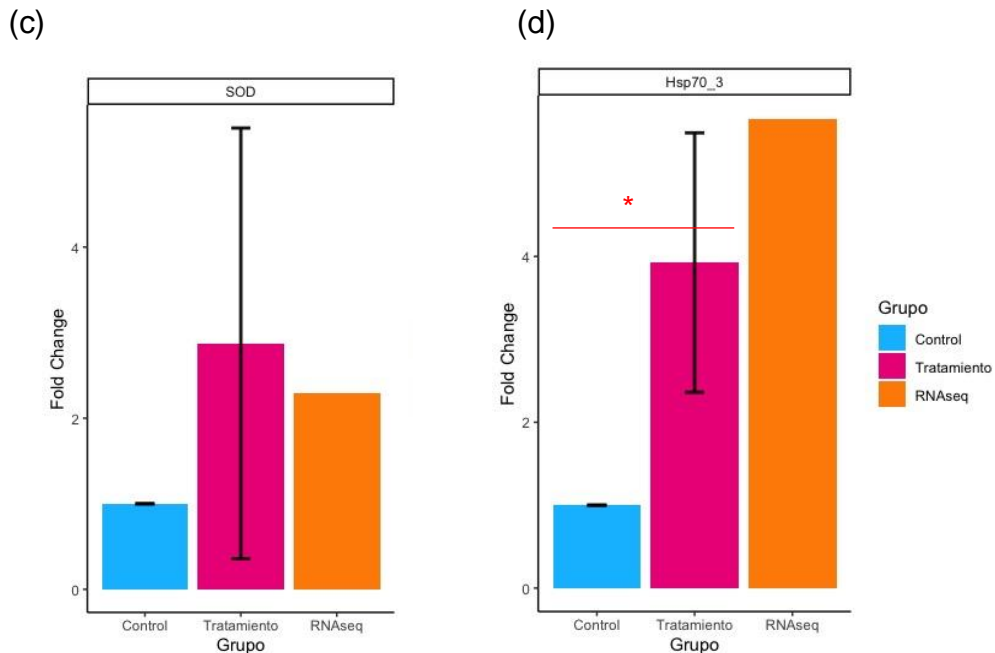


Figura 13. Cambio de expresión de los genes (a) VMT, (b) Hsp70_1, (c) SOD y (d) Hsp70_3 entre una condición control a 2 °C y un tratamiento a 8 °C obtenidos por qPCR y/o por RNaseq en *P. endiviifolia*. Las barras de error representan la desviación estándar. La barra roja con asterisco indica que hay diferencias significativas entre el control y el tratamiento.

Los resultados de los genes VMT (Figura 13 a) y Hsp70_1 (Figura 13 b), indican que el fold change del tratamiento presenta inhibición, por el contrario, el fold change del RNaseq indica sobreexpresión, por ende, los datos no se condicen. Por otro lado, los genes SOD (Figura 13 c) y Hsp70_3 (Figura 13 d) en el qPCR (tratamiento) el valor de fold change indica sobreexpresión al igual que en el RNaseq, en consecuencia, la verificación de qPCR para los datos de RNaseq se condice.

DISCUSIÓN

Respecto de las extracciones del material genético, ambos kit de extracción de ARN funcionaron bien con *P. endiviifolia*, pero no fue el caso de *A. utricularis*. Por esto, se decidió trabajar con el kit Favorgen, ya que se pudo usar para ambas macroalgas. La macroalga *P. endiviifolia* posee un talo laminar delgado de una capa de células (Jofre *et al.*, 2021), su estructura permitió lograr que la lisis de la célula fuera exitosa. Por otro lado, *A. utricularis* fue la muestra que presentó más desafíos a la hora de extraer el ARN, esto probablemente debido a que la pared celular de las algas pardas contienen polisacáridos como el alginato (Hernández-Carmona *et al.*, 2012), el cual confiere un aspecto viscoso e interfiere con la lisis de la célula.

El transcriptoma de *A. utricularis* reveló un total de 673 genes, de los cuales un 61% son de sobre-expresión, en ese sentido, de forma general se observa que se activaron los mecanismos especializados en el estrés abiótico, esta macroalga estaba enfrentando la condición de estrés por calor a 8 °C. No así, *P. endiviifolia*, la cual de un total de 654 genes, sólo un 10% son de sobre-expresión versus el 58% de genes que no presentan cambios significativos y el 32 % de los genes inhibidos, en ese sentido, se espera que *P. endiviifolia* tenga una respuesta negativa si la TSM aumenta en 6 °C. En parte, esta respuesta de *P. endiviifolia* podría ser esperable, ya que es endémica de Antártica y, en ese sentido, es más sensible a los cambios en su ambiente. *A. utricularis*, en cambio, se distribuye en Perú, Chile, Argentina, Islas Malvinas, Península Antártica, Nueva Zelanda e Islas subantárticas (Jofre *et al.*, 2021).

Las respuestas de *A. utricularis* en comparación a *P. endiviifolia* con respecto a los grupos de genes regulados al alza, muestran que de las 12 categorías de *A. utricularis* (sin contar la categoría “otros”), 4 de ellas también se expresan en *P. endiviifolia*; estas categorías son: “traducción”, “estrés”, “transporte” y “fotosíntesis”. Esto podría sugerir, que los mecanismos activados en respuesta al estrés abiótico por calor son similares. En cambio, en *P. yezoensis*, los genes que aumentaron en

respuesta al estrés son de categorías como “replicación”, “reparación ADN”, “síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico”. La única que se condice es “replicación”, la cual también se presenta en *P. endiviifolia*, pero hay que notar que en esta macroalga solamente se presentan dos genes de esa categoría. En la espinaca (Yan *et al.*, 2016) la respuesta al calor es mucho más amplia, algunas categorías funcionales de genes que coinciden con las de las algas de esta investigación son: “transporte”, “transcripción”, “fotosíntesis” y “metabolismo de glúcidos”. En *A. utricularis*, se observó que los genes de la categoría funcional fotosíntesis, se registraron inhibidos, y en ese sentido, se observa una respuesta coherente en cuanto a lo que le ocurre a *A. utricularis* frente al calor, ya que los genes expresados demuestran que los mecanismos que enfrentan el estrés abiótico, están activos.

Respecto de los genes que más representan el transcriptoma de ambas algas, estos se muestran en las Tablas 4,5,6 y 7, donde el criterio de selección fue los que presentaban mayores valores de Log (2) del Fold Change y a los cuales se logró clasificar en su grupo funcional, ya que como observaba en las Figuras 8, 9, 10 y 11, había un número importante de genes que quedaron sin clasificar. En cuanto a los genes de respuesta al calor que se han identificado en la literatura, hay tres de ellos que aparecen expresados en *A. utricularis*, que son el Transcription factor MYB3R-2, Hsp90 y Hsp70, lo cuales fueron identificados también en la espinaca (Yan *et al.*, 2016) y en *P. endiviifolia* las Hsp identificadas como la Hsp70 y otras que Hsp que no se identificaron por completo, se regulaban hacia la baja, es decir, había inhibición de estas chaperonas. En *Arabidopsis*, se identificó que el gen codifica para la Calmodulina se regulaba al alza, en este caso únicamente se encontró en *P. endiviifolia*, pero regulado a la baja. Para *A. utricularis*, los genes que codifican para histonas como la H3, H2B, también se observaron en el transcriptoma de *P. yezoensis* (Sun *et al.*, 2015), activando la transcripción bajo el estrés por calor. La transcripción cumple un rol fundamental en estados de estrés abiótico, ya que responde actuando con la región promotora de varios genes de respuesta al estrés, la importancia es que activa los grupos de genes que van a actuar directamente con

la condición de estrés (Guo *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2022). Respecto de los genes relacionados con el estrés oxidativo, en *A. utricularis* hay inhibición del gen iolG (mioinositol) que es un metabolito que está generalizado en plantas, animales bacterias y levaduras, y se reporta que aumenta sus niveles cuando hay acumulación de ROS, por tal razón se sugiere que esté relacionada al estrés oxidativo (Hu *et al.*, 2020). Además, en *A. utricularis* hay unos 3 genes relacionados con estrés oxidativo que se sobreexpresan que son SOD (superóxido dismutasa), GST (glutación s transferasa) y GSS (glutación sintetasa). Hay que notar que en el transcriptoma de *A. utricularis*, el gen iolG que codifica para el metabolito mioinositol, sólo se repite 3 veces, y se regula inhibiéndose y, de acuerdo a lo que estudió Hu *et al.*, 2020, si este gen se regula a la baja, quiere decir que hay una alta acumulación de ROS y, eso explicaría la sobreexpresión de los genes relacionados con el estrés oxidativo. Por otro lado, *P. endiviifolia* no presenta genes relacionados con el estrés oxidativo que se sobreexpresen, por el contrario, en los resultados de los genes que se regulan a la baja, hay genes que codifican para GST (glutación s transferasa) y GSS (glutación sintetasa), lo cual indica que los mecanismos para enfrentar el estrés oxidativo están inhibidos. También en *P. endiviifolia* el gen PER1 que codifica para la 1-cys peroxiredoxin, una enzima antioxidante, de acuerdo a Kim *et al.*, 2011 funciona aliviando el estrés oxidativo leve. Por último, otro gen interesante de mencionar que se inhibe en *P. endiviifolia*, es el gen 8-oxoG que codifica para guanina 8-oxo-7,8-dihidroguanina , esta molécula es una lesión en el ADN, esta no genera ningún cambio en la arquitectura de la doble hélice, es un marcador ubicado en el extremo 5' del ADN y que actúa indicando estrés oxidativo (Radak & Boldogh, 2010).

Para la comparación del “Fold change” (tasa de cambio en la expresión) del “control” versus el “tratamiento”, solo se trabajó con tres réplicas por cada una de las condiciones, es por esto que los datos no cumplieron con una distribución normal y se debió trabajar con el test estadístico Yuen para muestras no paramétricas y con un *n* bajo. Es posible que esto haya afectado al momento de la verificación de qPCR, en cuanto a la significancia de los datos. A pesar de esto, la verificación del

RNAseq mediante qPCR dio buenos resultado. Para *A. utricularis*, se condice el 100 % de los genes probados, en cambio, en *P. endiviifolia*, de los genes probados, un 50% de estos se condice con el RNAseq. Respecto de estos resultados, hay que notar que no se logró probar la cantidad de genes deseada, idealmente se esperaba poder tener 3 genes de expresión y 3 genes de inhibición para ambas especies, de modo de que tuviera una mejor representación. En otros trabajos, como el de Yan *et al.*, 2016, para la validación de qPCR trabajaron con 13 genes para verificar el transcriptoma de *S. oleracea*; para el transcriptoma de *Colobanthus quitensis*, verificaron 17 genes donde 14 de ellos se regulaban como sobreexpresión (Mi Cho *et al.*, 2018); en *P. seriata* probaron con 24 genes de respuesta al calor, 62,5% arrojaron una respuesta que se condice con sus análisis de RNAseq (Im *et al.*, 2015) y en *P. yezoensis*, al igual que en este trabajo, probaron siete genes elegidos al azar para la corroboración (Sun *et al.*, 2015). Se observa que en cada uno de estos trabajos no hay un consenso de cuantos genes sería el ideal a probar, esto refleja que queda a criterio del investigador el número de genes a verificar.

Una pregunta que queda, es qué ocurre con los genes que “no se condicen” en los análisis de verificación de qPCR, porque en *P. endiviifolia* hay dos genes que no se condicen con el RNAseq: Hsp70_1 y VMT, ya que el resultado de ambos qPCR indica inhibición y, por el contrario, el RNAseq reporta sobreexpresión. Entonces, ¿Cuál de los dos resultados es válido?, ¿el análisis de qPCR o el de RNAseq?. Coenye 2021, reporta que si bien hoy en día el qPCR es la herramienta que se utiliza para las validaciones en estudios transcriptómicos, sugiere que tal vez los análisis de RNAseq ya no necesitarán verificación por qPCR, ya que a diferencia de los microarrays, es un análisis más sensible, ya que entrega datos de prácticamente todos los genes. Además, se ha demostrado que en este tipo de estudios alrededor de un 20% de los genes pueden no ser concordantes en sus resultados al analizarlos con qPCR (Coenye, 2021).

Finalmente, se puede deducir que las respuestas de ambas algas frente al alza en la temperatura va a generar consecuencias en el desarrollo y sobrevivencia de

estas, pero *A. utricularis*, tal vez, pueda sobrevivir a las nuevas condiciones. No fue el caso para *P. endiviifolia*, ya que se vio realmente afectada con el estrés por calor. Es necesario generar mayor conocimiento de transcriptómica en macroalgas Antárticas, con el fin de revelar cuál es la respuesta general en condiciones adversas y también cuáles son sus respuestas actuales bajo condiciones de campo, puesto que hay muchos genes de los cuales aún se desconoce su función.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., & Grover, A. 2002. Plant Hsp100 proteins: structure, function and regulation. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 163(3), 397–405. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(02\)00209-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(02)00209-1)
- Aral, M., & Guan, J. 2016. Global sea surface temperature and sea level rise estimation with optimal historical time lag data. *Water*, 8(11), 519. <https://doi.org/10.3390/w8110519>
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Barati, B., Gan, S.-Y., Lim, P.-E., Beardall, J., & Phang, S.-M. 2019. Green algal molecular responses to temperature stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(2). <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2813-1>
- Celis-Plá, P., Moenne, F., Rodríguez-Rojas, F., Pardo, D., Lavergne, C., Moenne, A., Brown, M., Huovinen, P., Gómez, I., Navarro, N., & Sáez, C. 2020. Antarctic intertidal macroalgae under predicted increased temperatures mediated by global climate change: Would they cope? *The Science of the Total Environment*, 740(140379), 140379. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140379>
- Convey, P., Bindschadler, R., di Prisco, G., Fahrbach, E., Gutt, J., Hodgson, D. A., Mayewski, P., Summerhayes, C., Turner, J., & the ACCE Consortium. 2009. Antarctic climate change and the environment. *Antarctic Science*, 21(6), 541–563. doi:10.1017/S0954102009990642
- Gain, L. 1911. Une nouvelle espèce de *Monostroma* provenant de la région antarctique sud-américaine. *Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences*. 152: 724-726.

- Gómez, I., & Huovinen, P. (Eds.). 2020. *Antarctic seaweeds: Diversity, adaptation and ecosystem services*. Springer International Publishing.
- Guo, M., Liu, J., Ma, X., Luo, D., Gong, Z., & Lu, M. 2016. The plant heat stress transcription factors (HSFs): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00114>
- Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y., Arvizu-Higuera, D., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, J., & Muñoz-Ochoa, M. 2012. Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(2), 155-168.
- Hu, L., Zhou, K., Ren, G., Yang, S., Liu, Y., Zhang, Z., Li, Y., Gong, X., & Ma, F. 2020. Myo-inositol mediates reactive oxygen species-induced programmed cell death via salicylic acid-dependent and ethylene-dependent pathways in apple. *Horticulture Research*, 7, 138. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00357-2>
- Im, S., Choi, S., Hwang, M., Park, E., Jeong, W., & Choi, D.-W. 2015. De novo assembly of transcriptome from the gametophyte of the marine red algae *Pyropia seriata* and identification of abiotic stress response genes. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1343–1353. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0406-3>
- Jofre J., Dubrasquet H., Ram M., Navarro N. & Macaya, E. 2021. Guía de Macroalgas Subantárticas: Región de Magallanes y Antártica Chilena. Primera Edición, Punta Arenas, Chile, 160 pp.
- IPCC, 2018: Resumen para responsables de políticas. En: Calentamiento global de 1,5 °C, Informe especial del IPCC sobre los impactos del calentamiento global de 1,5 °C con respecto a los niveles preindustriales y las trayectorias correspondientes que deberían seguir las emisiones mundiales de gases de

efecto invernadero, en el contexto del reforzamiento de la respuesta mundial a la amenaza del cambio climático, el desarrollo sostenible y los esfuerzos por erradicar la pobreza [Masson-Delmotte V., P. Zhai, H.O. Partner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. P.an, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor & T. Waterfield (eds.)]

Kim, S. Y., Paeng, S. K., Nawkar, G. M., Maibam, P., Lee, E. S., Kim, K.-S., Lee, D. H., Park, D.-J., Kang, S. B., Kim, M. R., Lee, J. H., Kim, Y. H., Kim, W. Y., & Kang, C. H. (2011). The 1-Cys peroxiredoxin, a regulator of seed dormancy, functions as a molecular chaperone under oxidative stress conditions. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 181(2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.010>

Lee, R. 2018. Phycology. Cambridge university press, New York, 524pp.

Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., & Yu, D. 2010. Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Molecules and Cells*, 29(5), 475–483. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0059-2>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Müller, R., Desel, C., Steinhoff, F., Wiencke, C., & Bischof, K. 2012. UV-radiation and elevated temperatures induce formation of reactive oxygen species in gametophytes of cold-temperate/Arctic kelps (Laminariales, Phaeophyceae): ROS induction in kelp gametophytes. *Phycological Research*, 60(1), 27–36. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2011.00630.x>

Mulvaney, R., Abram, N. J., Hindmarsh, R. C. A., Arrowsmith, C., Fleet, L., Triest, J., Sime, L. C., Alemany, O., & Foord, S. 2012. Recent Antarctic Peninsula

- warming relative to Holocene climate and ice-shelf history. *Nature*, 489(7414), 141–144. <https://doi.org/10.1038/nature11391>
- Radak, Z., & Boldogh, I. 2010. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(4),587–596. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.008>
- Rodríguez-Rojas, F., López-Marras, A., Celis-Plá, P., Muñoz, P., García-Bartolomei, E., Valenzuela, F., Orrego, R., Carratalá, A., Sánchez-Lizaso, J., & Sáez, C. 2020. Ecophysiological and cellular stress responses in the cosmopolitan brown macroalga *Ectocarpus* as biomonitoring tools for assessing desalination brine impacts. *Desalination*, 489(114527), 114527. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2020.114527>
- Sáez, C. A., Ramesh, K., Greco, M., Bitonti, M. B., & Brown, M. T. 2015. Enzymatic antioxidant defences are transcriptionally regulated in Es524, a copper-tolerant strain of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Phycologia*, 54(4), 425–429. <https://doi.org/10.2216/15-30.1>
- Seckbach, J. 2010. *Seaweeds and their role in globally changing environments* (A. Israel, R. Einav, & J. Seckbach, Eds.; 2010a ed.). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8569-6>
- Sharkey T., Achraider S. 2006. High temperature stress. In: Madhava Rao K., Raghavendra A., Janardhan Reddy K. (eds). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, chapter 4, 101-129.
- Shi, J., Yan, B., Lou, X., Ma, H., & Ruan, S. 2017. Comparative transcriptome analysis reveals the transcriptional alterations in heat-resistant and heat-sensitive sweet maize (*Zea mays* L.) varieties under heat stress. *BMC Plant Biology*, 17(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0973-y>

- Skottsberg, C. 1921. Botanische Ergebnisse der schwedischen Expedition nach Patagonien und dem Feuerlande 1907-1909. VIII. Marine algae. I. Phaeophyceae. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar 61(11): 1-56.
- Smith, R. S., Takagishi, S. R., Amici, D. R., Metz, K., Gayatri, S., Alasady, M. J., Wu, Y., Brockway, S., Taiberg, S. L., Khalatyan, N., Taipale, M., Santagata, S., Whitesell, L., Lindquist, S., Savas, J. N., & Mendillo, M. L. 2022. HSF2 cooperates with HSF1 to drive a transcriptional program critical for the malignant state. *Science Advances*, 8(11), eabj6526. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj6526>
- Steig, E. J., Schneider, D. P., Rutherford, S. D., Mann, M. E., Comiso, J. C., & Shindell, D. T. 2009. Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957. *International Geophysical Year. Nature*, 457(7228), 459–462. <https://doi.org/10.1038/nature07669>
- Sutherland, J., S. Lindstrom, W. Nelson, J. Brodie, M. Lynch, M. Hwang, H. Choi., M. Miyata, N. Kikuchi, M. Oliveira, T. Farr, C. Neefus, A. Mols-Mortensen Milstein & M. Müller. 2011. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 47(5): 1131-1151.
- Teoh, M.-L., Chu, W.-L., & Phang, S.-M. 2010. Effect of temperature change on physiology and biochemistry of algae: a review. *Malaysian Journal of Science Series B*, 29(2), 82–97. <https://doi.org/10.22452/mjs.vol29no2.1>
- Team, R. C. 2013. R: A language and environment for statistical computing.
- Tuckett, P. A., Ely, J. C., Sole, A. J., Livingstone, S. J., Davison, B. J., Melchior van Wessem, J., & Howard, J. 2019. Rapid accelerations of Antarctic Peninsula outlet glaciers driven by surface melt. *Nature Communications*, 10(1), 4311. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12039-2>

- Wang, D., & Luthe, D. S. 2003. Heat sensitivity in a bentgrass variant. Failure to accumulate a chloroplast heat shock protein isoform implicated in heat tolerance. *Plant Physiology*, 133(1), 319–327. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018309>
- Wei, W., Qi, X., Wang, L., Zhang, Y., Hua, W., Li, D., Lv, H., & Zhang, X. 2011. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC Genomics*, 12(1), 451. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-451>
- Wiencke, C., Clayton, M. N., Gómez, I., Iken, K., Lüder, U. H., Amsler, C. D., Karsten, U., Hanelt, D., Bischof, K., & Dunton, K. 2007. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology*, 6(1–3), 95–126. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9106-z>
- Yan, J., Yu, L., Xuan, J., Lu, Y., Lu, S., & Zhu, W. 2016. De novo transcriptome sequencing and gene expression profiling of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves under heat stress. *Scientific Reports*, 6(1), 19473. <https://doi.org/10.1038/srep19473>
- Zhang, W., Zhou, R.-G., Gao, Y.-J., Zheng, S.-Z., Xu, P., Zhang, S.-Q., & Sun, D.-Y. 2009. Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149(4), 1773–1784. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133744>