



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Biología

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO  
EN GESTIÓN COSTERA

T E S I S   D O C T O R A L

---

**Expresión génica diferencial,  
por acción de compuestos volátiles,  
durante la carposporogénesis de la  
macroalga roja *Grateloupia imbricata***

---

Montserrat Montero Fernández  
Las Palmas de Gran Canaria - 2017







**D<sup>a</sup> MARÍA ISABEL PADILLA LEÓN, SECRETARIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR, ÓRGANO RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN GESTIÓN COSTERA, DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

### **CERTIFICA**

Que el Consejo de Doctores del Programa de Doctorado en Gestión Costera, en su sesión de fecha 1 de junio de 2017, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada:

"Expresión génica diferencial, por acción de compuestos volátiles, durante la carposporogénesis de la macroalga roja *Grateloupia imbricata*", presentada por la doctoranda: **D<sup>a</sup> Montserrat Montero Fernández** y dirigida por los Doctores Pilar García Jiménez y D. Rafael Robaina Romero.

Y para que así conste, a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, tribunal defensa y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo el presente en Las Palmas de Gran Canaria, a uno de junio de dos mil diecisiete.





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Anexo II

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN GESTIÓN COSTERA

**Expresión génica diferencial, por acción de compuestos volátiles, durante la carposporogénesis de la macroalga roja *Grateloupia imbricata*.**

Tesis Doctoral presentada por Montserrat Montero Fernández.

Dirigida por la Dra. Pilar García Jiménez y el Dr. Rafael Robaina Romero.

La Directora  
Pilar García Jiménez

El Director  
Rafael Robaina Romero

La Doctoranda  
Montserrat Montero Fernández

Las Palmas de Gran Canaria, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_







UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

La Dra. Pilar García Jiménez y el Dr. Rafael Robaina Romero del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo de investigación 'Expresión génica diferencial, por acción de compuestos volátiles, durante la carposporogénesis de la macroalga roja *Grateloupia imbricata*' realizado por la Lcda en Ciencias del Mar, Montserrat Montero Fernández, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a \_\_ junio de 2017.

Fdo.:

Pilar García Jiménez

Fdo.:

Rafael Robaina Romero



**al tiempo ...**

*'El tiempo amortigua las pesadumbres y las desavenencias, porque en él cambiamos y nos convertimos en cierto modo en otras personas'*

(Blaise Pascal)





## Agradecimientos

A la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información Gobierno de Canarias (ACIISI) y al Fondo Social Europeo (FSE) por concederme la Beca de Formación del Personal Investigador para la Realización de Tesis Doctorales, la cual ha permitido la finalización de este trabajo de Tesis así como los trabajos derivados de la misma.

A mis directores, Pilar García Jiménez y Rafael Robaina Romero, por darme la oportunidad de entrar en el apasionante mundo de la ciencia y la investigación de la Fisiología Vegetal Marina.

A Jose Ignacio, Carmen y Álvaro por seguir ahí en todos los malos momentos. Simplemente por eso, porque en muchas ocasiones sólo eso lo es todo.

A mi familia por todo el apoyo y la confianza.

A los integrantes del grupo de investigación GIAgen, especialmente a Juan Manuel Afonso, Maria Jesús Zamorano Serrano y a Guacimara Alejandro Hernández, por permitirme el acceso y uso de sus laboratorios así como por todo el apoyo y ayuda brindados.

A l@s compañer@s de los diferentes laboratorios de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, a los que siguen aquí y a los que se fueron, porque cada uno a su manera aportaron su granito de arena en el arduo camino que ha sido esta Tesis. Especialmente a Ico y a Leti, por su especial apoyo en las últimas etapas, y a Priscila por compartir los últimos momentos de 'crisis'.

A l@s compañer@s del laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Huelva: Ana, Antonio, Javi, Mari, Marta, Patri, Rocio y Rosa; simplemente GRACIAS.

A todo el personal y profesorado de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, especialmente a todos aquellos de la Facultad de Ciencias del Mar que durante este tiempo me han visto cruzar estos pasillos.

Finalmente, a toda la gente que es o ha sido compañera en la senda que es la vida, porque las jornadas transcurren y el final sucede, pero el recuerdo perdura.





# ÍNDICE





# Índice

Introducción General .....	21
Material y Métodos General .....	37
1. Recolección de muestras .....	37
1.1: Desinfección y limpieza .....	37
1.2: Clasificación del material de trabajo .....	39
2. Tratamiento de inducción .....	40
2.1: Fotoperiodo (FP) .....	40
2.2: Etileno (ET) .....	40
2.3: Metil jasmonato (MeJa) .....	40
3. Extracción de ADN .....	41
3.1: Verificación de la integridad y calidad del ADN .....	42
4. Extracción de ARN.....	42
4.1: Verificación de la integridad y calidad del ARN.....	43
5. Síntesis de ADNc mediante transcriptasa inversa .....	44
 Capítulo I .....	45
Introducción .....	47
Gen candidato en vegetales.....	55
<i>ODC</i> como gen candidato en la reproducción de las algas rojas.....	60
Regulación génica de <i>GiODC</i> .....	61
 Hipótesis y objetivos del capítulo .....	66
 Material y Métodos .....	67
1. Paseo cromosómico e IPCR .....	67
Aproximación 1 .....	67
Aproximación 2 .....	72
2. Análisis de las secuencias obtenidas e identificación de la zona 5' UTR del gen <i>GiODC</i> .....	77
3. Estructura nucleotídica de la 5' UTR y relación filogenética .....	78
4. Análisis de la expresión diferencial de <i>GiODC</i> bajo diferentes tratamientos inductores de la carposporogénesis.....	82
4.1: Tratamiento de las muestras .....	82
4.2: Determinación de la expresión .....	83
4.3: Análisis estadístico .....	84

Resultados .....	85
1. Paseo cromosómico, iPCR y análisis de las secuencias obtenidas .....	85
Aproximación 1 .....	85
Aproximación 2 .....	86
2. Identificación y análisis de motivos conservados en la zona 5' del gen <i>GiODC</i> .....	89
3. Estructura nucleotídica de la 5' UTR de diferentes genes <i>ODC</i> .....	92
4. Análisis de la expresión diferencial de <i>GiODC</i> bajo diferentes tratamientos inductores de la carposporogénesis .....	94
Discusión .....	96
1. Paseo cromosómico e iPCR .....	97
2. Identificación y análisis de motivos conservados en la zona 5' del gen <i>GiODC</i> .....	99
3. Estructura nucleotídica de la 5' UTR de diferentes genes <i>ODC</i> .....	106
4. Análisis de la expresión diferencial de <i>GiODC</i> bajo diferentes tratamientos inductores de la carposporogénesis .....	109
Conclusiones .....	114
Bibliografía.....	115
Capítulo II .....	139
Introducción .....	141
Papel de los compuestos volátiles en los organismos autótrofos .....	141
Los compuestos volátiles en plantas .....	142
Los compuestos volátiles en algas.....	146
Factores que afectan la emisión de volátiles en algas .....	151
Hipótesis.....	161
Objetivo 1 .....	161
Objetivo 2 .....	161

Material y Métodos .....	162
Objetivo 1 .....	162
1.1: Condiciones experimentales .....	162
1.2: ARN y transcripción inversa .....	162
1.3: Diseño de cebadores.....	162
1.4: Expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis .....	164
1.5: Análisis estadístico .....	166
Objetivo 2 .....	166
2.1: Condiciones experimentales .....	166
2.2: ARN y transcripción inversa .....	167
2.3: Diseño de cebadores .....	167
2.4: Expresión génica por acción del metil jasmonato durante la carposporogénesis .....	168
2.5: Análisis estadístico .....	169
Resultados .....	170
Expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis .....	170
Expresión génica por acción del metil jasmonato durante la carposporogénesis .....	175
Discusión .....	177
Caracterización de la expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis .....	177
Caracterización de la expresión génica por acción del metil jasmonato durante la carposporogénesis .....	182
Conclusiones .....	188
Objetivo 1 .....	188
Objetivo 2 .....	189

Bibliografía .....	190
Conclusiones Generales .....	209
Bibliografía general .....	213
Anexo: Publicaciones .....	225





# ÍNTRODUCCIÓN GENERAL



## Introducción

Las algas son organismos fotosintéticos presentes en la mayoría de los hábitats, desde marinos y de agua dulce hasta desiertos, manantiales o fuentes hidrotermales e incluso hielo. Presentan una morfología muy variada, cuyo rango varía entre pequeñas formas unicelulares a formas multicelulares increíblemente complejas. Su uso e importancia para el ser humano está ampliamente documentado, encontrándose casos de su empleo ya en el año 3.000 A.C. en China, como fuente de alimento y uso medicinal debido a su potencial antiparasitario (Torres *et al.*, 2014). Existen registros históricos de su empleo directo (p.e: como alimento humano y animal) e indirecto (p.e: obtención de tintes textiles) de estos organismos por parte de culturas tan diversas, y geográficamente alejadas, como los romanos, vikingos, aztecas y principalmente asiáticas (coreana, japonesa y china) que nos asevera que la importancia y beneficios de estos organismos era ya bien conocida desde la antigüedad (Pérez-González, 2013; Anand *et al.*, 2016).

Sin embargo, el estudio y conocimiento fisiológico de estos organismos, principalmente a nivel molecular, en comparación con el de las plantas superiores ha sido tradicionalmente mantenido en un segundo plano. No obstante, esta tendencia está siendo revertida en las últimas décadas debido especialmente al auge en el consumo y empleo de compuestos derivados algales. El uso de los mismos en sectores tan diversos: nutraceútica, alimentación, cosmética, medicina, industria, textil... ha convertido a las algas en sistemas claves para la investigación. Entre las aplicaciones más destacadas se encuentra el uso de extractos algales como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes en productos alimentarios e industriales. Muchos de estos productos son empleados en nuestra vida diaria, tales como cremas corporales o pasta de dientes; alimentos como yogures, queso, caramelos; o en diferentes pinturas y tintes para mejorar su consistencia (Pérez-González, 2013). En las últimas décadas, el concepto de 'cosmoceútico' resultado de la combinación de las palabras 'cosmético y farmacéutico' y entendido como '*compuesto que contiene principios activos de alta capacidad bioquímica*' ha impulsado aún más el estudio de las algas. La presión de la sociedad actual, cada vez más preocupada por la importancia de una vida saludable y el cuidado de los hábitos diarios, así como el mayor conocimiento disponible sobre la toxicidad de algunos productos presentes en el mercado, ha presionado a las compañías y gobiernos a exigir medidas y a buscar alternativas menos invasivas a tratamientos médicos. En este sentido y en comparación con las plantas terrestres, las algas son ricas en compuestos tales como fibra, ácidos grasos  $\omega$ -3, aminoácidos esenciales y vitaminas A, B, C y E, elementos esenciales en la industria cosmética y farmacéutica (Thomas y Kim, 2013; Anand *et al.*, 2016).

Otra de las aplicaciones más destacadas para estos organismos es su empleo en el proceso de obtención de biocombustibles como biogás y bioetanol (Notoya, 2010; Yanagisawa *et al.*, 2011) así como en la depuración y tratamiento de aguas residuales o en sistemas de acuicultura multitróficos, por su capacidad para eliminar el exceso de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (Abdel-Raouf *et al.*, 2012; Castine *et al.*, 2013; Milledge *et al.*, 2014; Turcios y Papenbrock, 2014).

Asimismo, las diferentes cualidades de las algas (principalmente microalgas), tales como una estructura sencilla, pequeño tamaño y alta tasa de replicación tanto en cultivo interior como exterior, les confiere un alto potencial biotecnológico. En este sentido, su alta capacidad para producir y acumular elevadas cantidades de metabolitos y compuestos bioactivos con alto valor económico e industrial (p.e: diferentes pigmentos, carbohidratos, vitaminas o lípidos), así como para crecer en medios con presencia de metales pesados (p.e: aguas residuales) y concentrarlos, las presenta como una alternativa interesante a los métodos tradicionales de biorremediación. Todos estos aspectos hacen de las microalgas sistemas atractivos para el estudio y manipulación genética y los convierten en candidatos ideales para su transformación.

Por su parte, las macroalgas presentan también un alto potencial a nivel económico a raíz de diferentes compuestos que pueden encontrarse en estos vegetales, tales como azúcares, metabolitos secundarios o polisacáridos. Los polisacáridos son polímeros compuestos por la asociación de diferentes monosacáridos o azúcares simples unidos por enlaces glucosídicos los cuales son predominantes en especies de algas pardas y rojas como *Acophyllum*, *Porphyra* (renombrada como *Pyropia*) (Sutherland *et al.*, 2011) o *Palmaria*; aunque también pueden encontrarse de manera significativa en algas verdes como *Ulva*, donde pueden alcanzar concentraciones de hasta el 65% de su peso seco (Kraan, 2012). Asimismo, se ha observado como la acumulación de polisacáridos presenta variaciones estacionales. Por ejemplo, en *Saccharina* sp. y *Laminaria* sp. el contenido de manitol presente en los talos del alga mostraba notables diferencias con máximos en verano y otoño; mientras que la presencia de ácido algínico era mayoritaria en los meses de marzo a junio (Haug y Jensen, 1954; Jensen, 1956).

Por otro lado, la naturaleza de los polisacáridos es altamente diversa. Así encontramos los conocidos como polisacáridos de pared, que conforman el talo del alga y cuya función primordial es ofrecer soporte al vegetal en el medio acuático. Este grupo está básicamente constituido por polisacáridos neutros, celulosa y hemicelulosa y de manera específica pueden encontrarse otros, como ocurre en el caso de *Ulva* sp. donde se da la presencia de lignina. En relación, las algas muestran ciertas especificidades atendiendo a su composición:

así las algas pardas contienen principalmente ácido alginico, laminarina ( $\beta$ -1,3-glucano) o fucoidán; las algas rojas, agar, carragenos, almidón de florídea o xilanos y, las algas verdes, galactanos sulfatados o derivados del ácido sulfúrico entre otros (Murata y Nakazoe, 2001; Kumar *et al.*, 2008).

La amplia variedad de estas sustancias así como sus diferentes propiedades por un lado confieren al vegetal cualidades interesantes con amplias y prometedoras perspectivas de estudio de cara a una mejora productiva, y por otro lado, sin embargo, dificultan dicho estudio ya que un mismo compuesto puede presentar diferentes grupos funcionales y por tanto, su clasificación es complicada.

Más aún, la enorme cantidad de especies de algas identificadas, aproximadamente unas 70.000 (Guiry, 2012) así como la heterogeneidad que presentan las mismas, dificulta enormemente la estandarización metodológica y la generalización de resultados de unas especies a otras.

No obstante y con todo esto, parece evidente el potencial de estos organismos y la importancia de ahondar en el conocimiento fisiológico de los mismos. En este sentido, uno de los aspectos más importantes pasa por conocer su ciclo de desarrollo y de manera específica, el proceso reproductivo así como los diferentes aspectos asociados al mismo (p.e: sustancias inductoras, genes afectados, regulación a nivel transcripcional y/o postranscripcional), lo que permitiría un control *in vitro* del mismo enfocado a fines como la mejora biotecnológica o la obtención de compuestos de interés a gran escala.

## **Elección de la especie de estudio y antecedentes previos**

### **Clasificación, distribución y fisiología**

Dentro de la vasta variedad que presentan las algas, aquellas correspondientes a la división Rhodophyta conforman un grupo único. Ciertos géneros de algas rojas como *Porphyra*, *Eucheuma*, *Gracilaria* o *Gelidium* son especialmente valorados económicamente por su empleo directo en la industria alimentaria o como fuente para la extracción de diversos compuestos derivados; como los ficocoloides (Hurd *et al.*, 2014). Así, la extracción de ficocoloides ha tenido una gran repercusión en la industria alimentaria, donde las propiedades de estos compuestos, tales como su alta temperatura de fusión o la textura que confieren a salsas o postres, han hecho que su uso se extienda a prácticamente la totalidad de procesos industriales de manipulación alimentaria (Kraan, 2012).

En este sentido, la alta plasticidad de las algas rojas implica una diversidad en estos organismos, tanto a nivel morfológico como fisiológico, que ha dificultado el proceso de clasificación de los mismos. Tradicionalmente, un sistema de dos clases (Bangiofitae y Florideofitae) basado principalmente en características morfológicas ha sido aceptado (Gabrielson y Garbary, 1985). No obstante, intentos de establecer una tipificación más exacta han sido llevados a cabo por diferentes autores. Para ello, un primer acercamiento se realizó mediante el empleo de técnicas moleculares (uso de los genes nucleares y/o plastídicos (16S SSU (*Smal Subunit*) o *rbcL*) (Yoon *et al.*, 2006, 2010; Miyagishima y Nakanishi, 2010; DePriest *et al.*, 2013) con el objetivo de establecer una especie 'modelo' tal como ocurre en microalgas con *Chlamydomonas reinhardtii* y plantas con *Arabidopsis thaliana*, la cual sirva como base para la investigación de estos organismos.

De manera similar, en macroalgas se han propuesto algunas especies como candidatos potenciales a organismo modelo (Chan *et al.*, 2006), sin embargo y a pesar de que el avance en las técnicas de secuenciación ha permitido la reciente obtención de genomas para algunas macroalgas rojas como *Chondrus crispus* (Collén *et al.*, 2013) o *Pyropia* sp. (Chan *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2013) o el alga parda *Ectocarpus siliculosus* (Cock *et al.*, 2010), las diferencias fisiológicas encontradas (nivel de organización, tamaño, composición pigmentaria...) y/o genómicas (número de genes, estructura del genoma..., Tabla 1) parecen dificultar el consenso, por lo que la elección de la especie de estudio parece más bien radicar en aspectos concretos del estudio en cuestión.

Tabla 1: Características de los genomas más representativos de diferentes tipos de algas.

	Especie	Tamaño del genoma	Nº de genes	Contenido G+C (%)	Año	Referencias
Roja	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> Strain: 10D	16,5 Mb	5.331	55,0	2004, 2007	Matsuzaki <i>et al.</i> , 2004; Nozaki <i>et al.</i> , 2007.
	<i>Galdieria sulphuraria</i>	13,7 Mb	6.623			Barbier <i>et al.</i> , 2005; Schönknecht <i>et al.</i> , 2013.
	<i>Porphyridium purpureum</i>	19,7 Mb	8.355		2013	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2013.
	<i>Chondrus crispus</i>	105 Mb	9.606	40-60	2013	Collén <i>et al.</i> , 2013.
	<i>Pyropia yezoensis</i>	43 Mb	10.327	63,6	2013	Nakamura <i>et al.</i> , 2013.
Verde	<i>Ostreococcus tauri</i>	12,56	8.166	58	2006	Derelle <i>et al.</i> , 2006; Palenik <i>et al.</i> , 2007.
	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	13,2 Mb	7.651	60	2010	Moreau <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503 Cw92 mt+	111 Mb	15.147	64	2003; 2007	Grossman <i>et al.</i> , 2003; Shrager <i>et al.</i> , 2003; Merchant <i>et al.</i> , 2007.
	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP-1545	21,9 Mb	10.575	65	2007	Blanc <i>et al.</i> , 2010; van Baren <i>et al.</i> , 2016.
	<i>Micromonas commoda</i> RCC299	20,9 Mb	10.056	64	2010	Blanc <i>et al.</i> , 2010; van Baren <i>et al.</i> , 2016.
	<i>Chlorella variabilis</i> NC64A	46,2 Mb	9.791	67	2010	Blanc <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169 NIES 2166	48,8 Mb	9.851	53	2012	Blanc <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Volvox cartieri</i>	138 Mb	14.516	56	2010	Prochnik <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Dunaliella salina</i>				2010	DOE Joint Genome Institute; Smith <i>et al.</i> , 2010. No completo.
<i>Bathycoccus prasinos</i>	151 Mb	7.847	48		Moreau <i>et al.</i> , 2012.	
Parda	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	195,8 Mb	16.256	53,6	2010	Cock <i>et al.</i> , 2010.

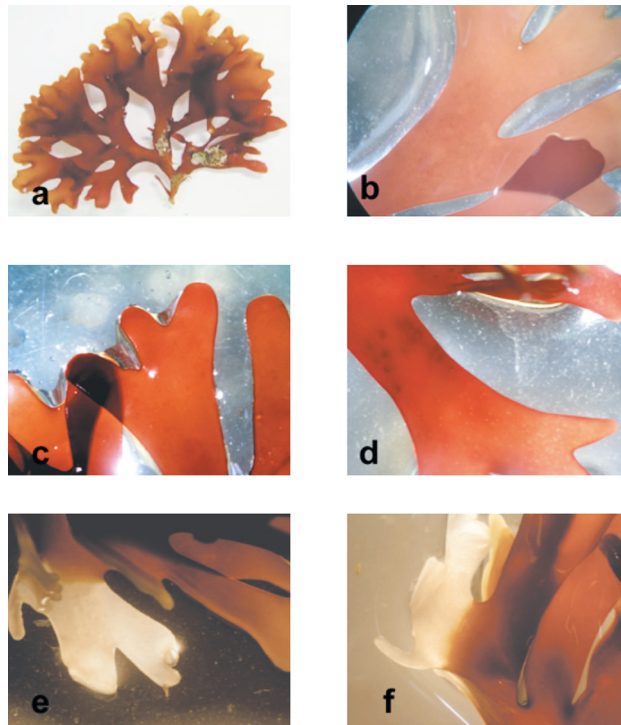
En este sentido, García-Jiménez y Robaina, 2015, pusieron de manifiesto la necesidad de una mayor investigación, tanto a nivel fisiológico pero principalmente a nivel molecular, centrada en la división Rhodophyta. Así destacaron, entre otros aspectos, la complejidad de estos organismos en cuanto a sus ciclos de vida, la falta de conocimiento en relación a los diferentes aspectos asociados al proceso reproductivo así como la falta de consenso en una metodología que permita una selección adecuada de las estirpes de interés y su consiguiente cultivo y producción bajo condiciones controladas *in vitro*.

Al respecto, estos autores propusieron que la mejor manera de abordar el estudio desde un punto de vista general es a través de una especie cuyo ciclo de vida sea relativamente corto, fácilmente distinguibles sus etapas de vida y que nos permita un manejo 'sencillo' de la misma bajo condiciones de laboratorio. Así, el alga roja filamentosa *Bonneimasonia hamifera* (Bonnemaisoniaceae) ha sido considerada como la especie futura de trabajo. La caracterización de su ciclo de vida trifásico, el cultivo de su fase esporofítica (*Trailliella*) en laboratorio y la diferenciación de la fase gametofítica a través de la inducción con diferentes condiciones de cultivo, como luz y temperatura, así como con sustancias reguladoras del desarrollo, presentan prometedoras expectativas para el avance del conocimiento molecular en algas rojas mediante la manipulación de dicha especie (García-Jiménez y Robaina, 2015).

En oposición a la relativa simplicidad de *B. hamifera*, la especie modelo empleada hasta la fecha por nuestro grupo para el estudio del proceso reproductivo ha sido la macroalga roja, *Grateloupia imbricata*, perteneciente a la clase Florideophyceae, orden Halymeniales, familia Halymeniceae.

*Grateloupia* es el género más extenso de esta familia, comprendiendo más de 90 especies (Lee *et al.*, 2009; DePriest *et al.*, 2013). Morfológicamente, *Grateloupia* presenta un talo laminar con una longitud variable, desde unos 2 cm en los ejemplares más pequeños hasta 7 cm (Fig. 1).





**Figura 1:** Imágenes de la macroalga roja *Grateloupia imbricata*. a) vista general de un ejemplar de alga; b y d) detalle del talo sin presencia de cistocarpos y con presencia de cistocarpos respectivamente; c) detalle de la parte apical del talo; e y f) ápices decolorados tras la exposición a fotoperiodo 18 h luz (L): 6 h oscuridad (O).

Las ramificaciones cortas con ápices redondeados e irregulares son frecuentes en *G. imbricata*, mientras que otras especies de *Grateloupia* pueden presentar ramificaciones alargadas y estrechas, con ápices punteados, bifurcados o con forma de cuerno, *antler-like*, o incluso talos lineares sin ramificaciones (Yang y Kim, 2015). *Grateloupia* muestra una distribución geográfica amplia principalmente en aguas templadas y tropicales (Mateo-Cid *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008), llegando a ser considerada por ciertos autores como una especie introducida y en muchos casos invasiva (Marston y Villalard-Bohnsack, 2002; García-Jiménez *et al.*, 2008).

Inicialmente, *G. imbricata* fue clasificada como *Grateloupia doryphora* en base a sus características morfológicas y estudios botánicos previos. Sin embargo, y tras la identificación molecular llevada a cabo con los genes *rbcL*, que codifican para la subunidad grande de la RubisCo (García-Jiménez *et al.*, 2008) fue reasignada como una especie independiente.

## La reproducción en algas rojas

El paso o transición de una etapa vegetativa a una reproductiva es un proceso complejo el cual supone numerosos cambios tanto a nivel molecular, estructural como fisiológico. La mayoría de macroalgas rojas presentan alternancia de generaciones: una sexual (gametofítica) y otra asexual (esporofítica).

En el caso de *G. imbricata*, el ciclo sexual es trifásico (Cole y Sheath, 1990; García-Jiménez, 1994; García-Jiménez y Robaina, 2015) en el cual tres generaciones diferentes se suceden: gametofito, carpoesporofito y tetraesporofito. Tanto el gametofito como el tetraesporofito se desarrollan de manera independiente y constituyen una fase de vida libre, mientras que el carpoesporofito se encuentra adosado al gametofito femenino. Morfológicamente, tanto los gametofitos haploides como el tetraesporofito diploide son similares.

Las tetraesporas (haploides) formadas por meiosis germinan dando lugar a un talo multicelular (gametofito) masculino y femenino. Cuando el gametofito femenino es fecundado (carpogonio) se forman unas estructuras diploides conocidas como cistocarpos. El cistocarpo se compone de una parte interna o núcleo y una parte exterior, el pericarpio, presentando a su vez, una zona más interna de tejido medular o subcortical y una zona cortical más externa y pigmentada. En algunas clases como Halymeniales, el pericarpio está ausente por lo que el cistocarpo está constituido únicamente por la zona nuclear (Hommersand y Fredericq, 1990). Tras diferentes procesos de diferenciación celular, los cistocarpos producirán carpoesporas diploides que serán finalmente liberadas y desarrollarán el tetraesporofito diploide, el cual generará las tetraesporas; finalizando así el ciclo (Fig. 2). El mecanismo por el que se generan las tetraesporas, conocido como tetraesporogénesis es un proceso asincrónico y gradual, siendo frecuente encontrar en un mismo talo diferentes grados de desarrollo del mismo (Rodrigo, 1998).

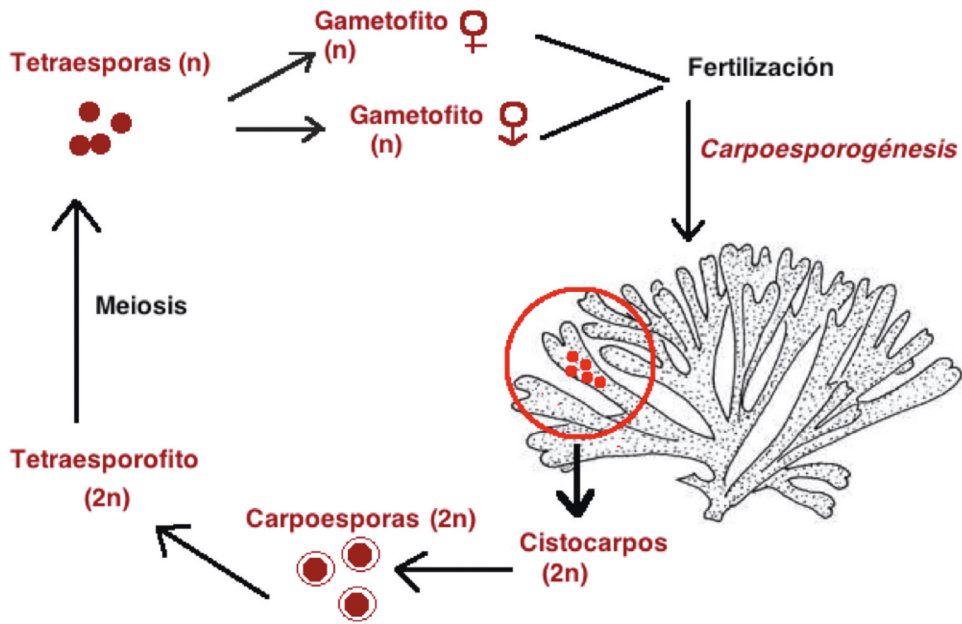


Figura 2: Esquema del ciclo reproductivo de la macroalga roja *Grateloupia imbricata*.

Los datos existentes a nivel citológico e histológico han permitido el estudio de diversos aspectos que acompañan el desarrollo tanto del proceso de carposporogénesis como tetraesporogénesis en distintos grupos de algas (Wetherbee, 1978, 1980; Tsekos, 1981, 1983; Tsekos y Schnepf, 1983).

Sin embargo, el crecimiento y desarrollo desde que la espora germina hasta que se constituye en un talo adulto es un proceso que comprende varias etapas y que en macroalgas rara vez acontece de manera directa, sino que existen diferentes estadios intermedios de desarrollo: *germlings* y *sporelings* (Vadas *et al.*, 1992; Rodrigo, 1998). No obstante, la complejidad y diversidad previamente mencionada para estos organismos, implica que incluso estos estadios aparentemente establecidos muestren diferencias entre especies y por tanto, la determinación y caracterización del grado de desarrollo del tejido estudiado debe ser acompañada con aspectos fisiológicos, estructurales y/o genéticos adecuados para cada especie.

En este sentido y de manera específica para *G. imbricata*, Rodrigo, 1998, estableció los diferentes estadios de crecimiento a partir de la propagación *in vitro* de carposporas. Así sabemos que existen cuatro estadios claramente diferenciados: 0, I, II y III (Tabla 2).

**Tabla 2: Tabla adaptada de acuerdo a lo establecido por Rodrigo, 1998.**

Estadio	Tiempo (días)	Características del tejido
0		Las carpoesporas son liberadas espontáneamente y germinan.
I	30-40	3-4 ejes de crecimiento. Crecimiento moderado.
II	40-60	Fase de transición. Difícil la diferenciación morfológica ya que los individuos presentan características intermedias entre el estadio I y III.
III	> 80	Fase estacionaria de crecimiento. Talo bien pigmentado con ejes de crecimiento de más de 5 cm con ramificación apical.

Este trabajo permitió establecer de manera clara y precisa los primeros estadios de crecimiento del alga *G. imbricata*, lo que de manera general conoceríamos como *sporeling* o esporas germinadas. Sin embargo hasta llegar a conformar un tejido adulto y reproductivamente maduro son necesarias modificaciones adicionales a distintos niveles fisiológicos. Por tanto, una de las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo es que el ciclo vital de esta macroalga roja es extremadamente complejo. Considerando únicamente tejido joven encontramos cuatro estadios diferentes de crecimiento, lo que extrapolado al ciclo completo de vida, supone un cantidad considerable de etapas de las cuales no tenemos apenas conocimiento. En este punto la diferencia entre juvenil (infértil) y adulto (fértil) vendría dada por la madurez sexual y presencia de estructuras reproductoras o cistocarpos, aunque el momento preciso en que este cambio ocurre no es fácil de establecer.

Este paso al estado reproductivo es impulsado por numerosos factores los cuales son diversos y complejos. Así, numerosos autores han determinado la importancia de múltiples factores tanto endógenos (p.e: auxinas o giberelinas) como exógenos (luz, temperatura o salinidad) en el devenir del proceso reproductivo en vegetales. Así, la transición del estado adulto vegetativo a adulto reproductivo implica el cambio de un estado 'normal' de crecimiento a la generación y soporte de las estructuras reproductivas, lo que necesariamente conlleva el reajuste interno de los recursos disponibles. En este estado de cambio, se espera que las diversas señales o factores actúen provocando el comienzo de esta fase reproductiva creando un ambiente o situación óptima para que este proceso tenga lugar, aunque las condiciones exactas que desencadenan el mismo no son del todo conocidas.

En plantas superiores se ha establecido que el éxito reproductivo depende en gran medida del momento en que la floración tiene lugar, el cual parece desencadenado en respuesta a diversas condiciones (Mouradov *et al.*, 2002; Ausín *et al.*, 2005). Así por ejemplo, las diferentes señales externas son reconocidas y reguladas por el vegetal, lo que conducirá a la generación del fruto. No obstante, condicionantes adicionales deben existir cuando se ha observado como incluso dándose todas las condiciones ambientales adecuadas, la planta no es capaz de desarrollar las estructuras reproductoras (Lawson y Poethig, 1995). En este sentido por tanto, el tejido vegetal en estado juvenil o adulto asimismo debe adquirir el grado de competencia necesario para percibir e integrar las señales, tanto externas como internas, necesarias para que esta transición comience (McDaniel *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 1992; Huala y Sussex, 1993).

De igual forma en algas, factores de naturaleza endógena, como los compuestos reguladores del desarrollo auxinas, citoquininas o poliaminas, y exógena, como la calidad y cantidad de luz (fotoperiodo), la temperatura o la disponibilidad de nutrientes (Cole y Sheath, 1990) han sido destacados como determinantes en el inicio del proceso reproductivo. En este sentido, Rodrigo (1998) observó como variaciones en el régimen de luz inducían las primeras etapas del proceso de tetraesporogénesis en talos jóvenes de la macroalga roja *G. imbricata*. Posteriormente, se ha mostrado como el tratamiento con ciertos compuestos volátiles, p.e: el etileno y el metil jasmonato, altera el proceso normal de formación de las estructuras reproductivas *in vitro* (García-Jiménez y Robaina, 2012; García-Jiménez *et al.*, 2016). Específicamente y de todos los reguladores estudiados, se ha establecido que la luz, las poliaminas, el etileno y el metil jasmonato son los inductores que afectan en mayor medida la carposporogénesis en algas rojas (Guzmán-Urióstegui *et al.*, 2002; Sacramento *et al.*, 2004, 2007; García-Jiménez y Robaina, 2012; García-Jiménez *et al.*, 2016; Montero-Fernández *et al.*, 2016).

Asimismo, la competencia del tejido es otro factor determinante. En este sentido, el trabajo realizado por Rodrigo, 1998, además de establecer unas bases de referencia para la fisiología y cultivo de *G. imbricata*, aportó luz sobre el papel que ciertos compuestos reguladores del desarrollo o ciertas condiciones de cultivo afectan el desarrollo *in vitro*. Así se ha visto como en esta especie los estadios jóvenes son capaces de responder y presentar cambios fisiológicos y morfogenéticos ante la inducción con reguladores del desarrollo tales como kinetina o auxinas, mientras que previamente se había observado que el tratamiento con kinetina en talos adultos no provocaba efecto alguno (Robaina, 1988). Sin embargo y aunque la respuesta de las algas ante el tratamiento con reguladores es diversa y los resultados controvertidos, sí se ha determinado la capacidad de estos compuestos para afectar aspectos diversos de la fisiología vegetal y en este sentido, Baweja y colaboradores, 2009, manifestaron la

importancia y necesidad de un tejido adecuado capaz de responder ante el estímulo. Así se determina que el tejido joven es receptivo ante el estímulo mientras que el adulto no (García-Jiménez *et al.*, 1998).

De manera específica y relacionado con el proceso reproductivo, las poliaminas (PAs) fueron de los primeros reguladores estudiados. Así, se ha observado como su aplicación sobre tejido infértil fomenta el desarrollo y la aparición de las estructuras reproductoras en *Gracilaria cornea* y *Grateloupia* sp. (Guzmán-Urióstegui *et al.*, 2002; Sacramento *et al.*, 2004), mostrando además la necesidad de la presencia de la poliamina espermina (Spm) para la esporulación y consiguiente liberación de esporas en ambas macroalgas (Guzmán-Urióstegui *et al.*, 2002; Sacramento *et al.*, 2004, 2007).

Estas respuestas *in vitro*, se asociaron de manera directa a las actividades metabólicas de síntesis de las PAs, cuya ruta de síntesis comienza con la obtención de putrescina (Put) a partir de los aminoácidos ornitina y arginina a través de una reacción de descarboxilación. En *G. imbricata* se ha comprobado como este proceso ocurre principalmente a través de la vía de la ODC y es controlado en primera instancia por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). Esta enzima parece ser por tanto el elemento limitante en la obtención de estas sustancias, y por tanto principal reguladora del proceso de carposporogénesis (Sacramento *et al.*, 2004, 2007).

Posteriormente, la influencia de otro tipo de reguladores de naturaleza volátil y considerados como fitohormonas ha sido evaluado. Así, el tratamiento exógeno con etileno regula diversos aspectos del proceso reproductivo en diferentes especies de algas rojas. Por ejemplo, en *Pterocladia capillacea* la aplicación de etileno induce la formación y maduración *in vitro* de las estructuras tetraesporangiales (García-Jiménez *et al.*, 2012). Este hecho ha sido relacionado con la actividad enzimática de las enzimas de síntesis ACS (ACC sintasa) y ACO (ACC oxidasa) involucradas en la propia síntesis del etileno. La concentración de estas enzimas, así como aquella de la poliamina putrescina fueron cuantificadas tras la incubación del alga con ET a diferentes tiempos (García-Jiménez *et al.*, 2012). Los resultados revelaron por un lado que la producción de ET está correlacionada con la actividad enzimática de ACC y ACO y, que los niveles de Put aumentan de manera coincidente con la liberación de etileno, lo que sugiere que ambas rutas de síntesis, poliaminas y etileno, trabajan en sinergia.

Por otro lado y de manera mas reciente también se ha visto como la aplicación exógena de metil jasmonato (MeJa), un compuesto lipídico derivado del ácido jasmónico, altera el patrón normal del proceso reproductivo *in vitro* de *G. imbricata*. El tratamiento con este compuesto provoca un aumento en el número de cistocarpos en los talos de las algas rojas, una disminución

en el tiempo de formación y aparición de las estructuras así como la apertura de las mismas, proceso conocido como dehiscencia, y la subsiguiente liberación de esporas (García-Jiménez *et al.*, 2016). Asimismo, en *Gelidium arbuscula* la aplicación de MeJa favorece la coexistencia de las fases reproductivas; es decir, en un mismo individuo es posible encontrar de manera simultánea tanto carposporangios como tetraesporangios a las 48 h posteriores al tratamiento (García-Jiménez y Robaina, 2017, *en prensa*). Asimismo, la detección de derivados lipídicos a través de la técnica de cromatografía de gases-masa (GC-MS) en este alga (García-Jiménez *et al.*, 2013) indica la capacidad de las algas rojas de producir este tipo de sustancias, cuya ruta de síntesis podría ocurrir por la vía de los octadecanoides a partir del ácido linolénico. A través de la oxidación enzimática mediada por distintas enzimas se obtiene ácido jasmónico (JA) (Beale y Ward, 1998; Fernández Calvo, 2011; Yan *et al.*, 2013; Fernández-Barbero, 2015). Posteriormente, se obtiene metil jasmonato a partir del JA mediado por la acción de SAM, el cual sirve como dador de grupos metilo y finalmente la enzima JMT (*Jasmonic Acid Methyl Transferase*) transforma el JA en MeJa (Roje, 2006; Zhao *et al.*, 2013).

Por tanto, parece evidente que tanto las poliaminas, el etileno y el metil jasmonato juegan un papel fundamental en el desarrollo del proceso reproductivo en algas rojas. Mas aún, parece que las tres rutas están relacionadas a través de SAM, el cual funciona como intermediario común: por un lado regulando la síntesis de ET, y por otro suministrando grupos metilo, para la síntesis de MeJa, y aminopropilos para la síntesis de las poliaminas espermidina y espermina respectivamente.

La síntesis de las poliaminas es dirigida por la enzima ODC, cuyo gen codificante *ODC* presenta expresión génica de manera diferencial tanto durante el proceso de la carposporogénesis como a través del tratamiento con los inductores previamente mencionados (etileno y metil jasmonato).

Así, y a partir de la secuencia del gen *ODC* en la macroalga roja *G. imbricata* (*GiODC*, FJ 223132) obtenida mediante paseo cromosómico en 2009 por García-Jiménez y colaboradores, se consiguió monitorizar su expresión durante la formación del cistocarpo *in vitro*. De esta manera y a través del empleo de la técnica de PCR cuantitativa con el fluoróforo Syber Green y sonda de hidrólisis, se demostró que existía expresión diferencial dependiendo de la zona del talo (zona basal del talo frente a la apical) y de la presencia o ausencia de cistocarpos. Asimismo y con la técnica de hibridación *in situ* (ISH) se observó como esta expresión es coincidente con las actividades enzimáticas medidas previamente para la ODC y los niveles endógenos de las PAs, revelando máximos de expresión en la zona basal del talo, donde no se encuentran cistocarpos y el tejido es infértil (García-Jiménez *et al.*, 2009). De igual forma,

estudios posteriores han mostrado como la inducción de tejido infértil con diferentes regímenes de fotoperiodo, etileno y metil jasmonato alteran de manera diferencial los patrones de expresión del gen *ODC* en función tanto del tipo de inductor como del grado de desarrollo del tejido, afectando consecuentemente el desarrollo del proceso reproductivo (capítulo 1 de esta tesis, Montero-Fernández *et al.*, 2016).

Actualmente, el futuro de la investigación a nivel molecular pasa por la implementación y desarrollo de las técnicas biotecnológicas, principalmente la transformación celular. En este aspecto, el estudio en el campo de las macroalgas presenta una demora considerable en comparación con microalgas y principalmente con plantas superiores. No obstante, la relevancia que las macroalgas están adquiriendo a nivel global así como la adquisición de una mayor conciencia en relación a las múltiples propiedades y beneficios que presentan estos organismos en diferentes aspectos de la economía, la salud y consecuentemente, la calidad de nuestra vida diaria, los ha situado como objetivos potenciales de estudio. Este creciente interés ha impulsado la investigación de los diferentes aspectos que atañen la fisiología de estos vegetales de cara a una posible modificación génica con aplicaciones en diferentes campos biotecnológicos. Al respecto, diversos autores han evaluado diferentes métodos para su transformación, tales como bombardeo con partículas, electroporación o a través de la infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Estas técnicas se han probado en varias algas como *Porphyra sp.*, *Kappaphycus alvarezii* o *Gracilaria gracilis* entre otras, con resultados varios, en algunos casos logrando tanto expresiones transitorias como estables y demostrando así su eficacia (Qin *et al.*, 2012; revisado en Mikami, 2013). Estos resultados ponen de manifiesto que efectivamente es posible modificar estos organismos en un ambiente controlado. Ahora bien, a raíz de estos mismos trabajos la falta de información molecular específica referente a algas rojas se ha hecho patente, evidenciando la problemática que supone la falta de genomas completos disponibles así como la necesidad de identificación de secuencias promotoras específicas para estos organismos que permitan el diseño e implementación de vectores fiables y funcionales (Lin y Qin, 2014).

Así, y con el objetivo en mente de adquirir un mayor conocimiento sobre los diferentes aspectos implicados en la regulación molecular del proceso reproductivo en algas rojas y una posible futura modificación biotecnológica, planteamos como objetivo principal de esta Tesis realizar un primer acercamiento a la intrincada red molecular que sostiene el proceso de carposporogénesis en la macroalga roja *Grateloupia imbricata*. Para ello y tomando como referencia el gen *ODC* y los trabajos previos que lo sitúan como potencial candidato del proceso reproductivo, evaluaremos la importancia y el posible efecto que diferentes reguladores pueden ejercer sobre su regulación a nivel génico, así como la posibilidad de que otros genes estén asimismo implicados en dicho evento.





# MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL



# Material y Métodos General

Los pasos de 1) recolección de muestras y limpieza, 2) tratamiento de inducción, 3) extracción de ADN y verificación de la integridad y calidad del mismo, 4) extracción de ARN y verificación de la integridad y calidad del mismo, y 5) síntesis de ADNc mediante transcriptasa inversa, serán comunes a todos los estudios realizados. Con el fin de no caer en repetición se explicarán una primera vez y posteriormente, y en cada capítulo se hará referencia al apartado correspondiente del Material y Métodos general.

## 1. Recolección de muestras

### 1.1: Desinfección y limpieza

Las talos de *Grateloupia imbricata* se recogieron en la localidad de San Cristóbal (Fig. 1), en la costa noreste de la isla de Gran Canaria, aprovechando periodos de marea baja y, en la medida de lo posible, coincidentes con las primeras horas del día para asegurar el menor lapso de tiempo entre el muestreo y la limpieza y tratamiento en el laboratorio.



Figura 1: Imagen de la zona de muestreo en la localidad de San Cristóbal, Las Palmas de Gran Canaria.



Los ejemplares se localizaron fijos anclados por su disco de fijación y sumergidos en pequeños charcos rocosos intermareales (Fig. 2). Los talos, cortados cuidadosamente, dejando el disco para su regeneración e intentando dañar lo menos posible el tejido, fueron depositados en recipientes de plástico con agua marina fresca para el traslado.



**Figura 2: Detalle de la zona de muestreo del alga *Grateloupia imbricata*. En la imagen se aprecian los charcos rocosos en el intermareal donde se encuentra el alga de forma natural.**

En el laboratorio, los talos fueron lavados con agua de mar filtrada y esterilizada previamente en autoclave. Los epífitos y microbiota asociada se eliminaron mediante cepillado suave. A continuación se sumergieron en baño de ultrasonido con agua destilada durante 3 periodos de 1,5 min cada uno. El choque osmótico y el ultrasonido completaron el proceso de eliminación de la biota.

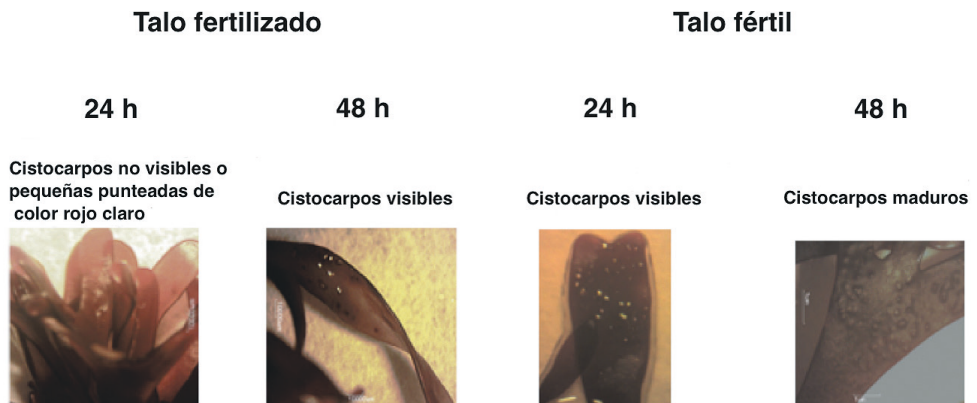
En función de la finalidad de estudio, los talos fueron seleccionados y separados de acuerdo a su estado reproductivo y depositados en agua de mar estéril para su tratamiento y posterior cultivo, o se retiró el exceso de agua y congelaron inmediatamente para la posterior extracción de ADN.

## 1.2: Clasificación del material de trabajo

En aquellos casos donde un tratamiento posterior fue necesario, la clasificación de los talos se hizo de acuerdo a la presencia o no de estructuras reproductoras o cistocarpos.

Los cistocarpos aparecen como pequeñas protuberancias, de menos de 1 mm de diámetro de coloración oscura en la parte apical del talo. De esta manera, el material algal se considera infértil cuando visualmente los cistocarpos no están presentes y por el contrario, serán fértiles cuando las estructuras se hagan claramente visibles (coloración oscura). De igual forma, se considera fertilizado cuando el talo no presenta cistocarpos, o estos son muy incipientes (coloración rojiza clara), pero proviene del mismo disco de fijación que otro fértil. Así, los cistocarpos de los talos fertilizados presentan una tonalidad rojo claro, la cual se torna oscura según el tejido madura y aparece el cistocarpo.

Aunque únicamente tres etapas son claramente distinguibles, la compleja transición que supone el paso de una etapa vegetativa a una reproductiva, marcada por la aparición de la estructura, hace suponer que existan estados intermedios los cuales no puedan ser diferenciados a simple vista (Fig. 3).



**Figura 3: Esquema simplificado del proceso de maduración de los cistocarpos presentes en tejido fertilizado (A) y tejido fértil (B).**

Todo el material de laboratorio empleado fue esterilizado en autoclave dos veces durante 1 hora a 121 °C previo a su uso. De esta manera, aseguramos esterilidad durante todo el proceso.

## 2. Tratamiento de inducción de las estructuras reproductoras

### 2.1: Fotoperiodo (FP)

En relación al FP, se probaron 3 regímenes distintos: FP de día largo (12 h L: 12 h O), FP de día corto (8 h L: 16 h O) y FP control (18 h L: 6 h O). De acuerdo a Rodrigo, 1998, la inducción de las estructuras reproductoras ocurre a las 2 semanas de cultivo favorecida a través del tratamiento con un régimen 12 h L: 12 h O, mientras que a régimen 8 h L: 16 h O, el tiempo requerido es superior.

### 2.2: Etileno (ET)

El tratamiento con ET se realizó de acuerdo a lo descrito en García-Jiménez y Robaina, 2012. Se aplicó de manera exógena etileno (pureza 99,9%; Carburos Metálicos SA, Barcelona, España) con flujo de 0,5 L min<sup>-1</sup> durante 15 min en recipientes herméticamente cerrados conteniendo los talos frescos del alga. Tras los 15 min, se tomaron muestras de 100 mg y se homogeneizaron en nitrógeno líquido. Asimismo para validar el efecto del ET, de manera paralela talos frescos fueron previamente tratados con 4m M de tiosulfato de plata (STS) (Sigma Co), un inhibidor de la señalización del etileno, previo a la exposición con el mismo. Las muestras se mantuvieron en cultivo una semana, periodo necesario para la aparición de las estructuras reproductoras.

### 2.3: Metil jasmonato (MeJa)

Los talos frescos fueron colocados en placas de Petri con papel de filtro y rociadas tres veces con 1 mL de una solución de MeJa 100 mM (Sigma Co.) en 0,01 % (v/v) (etanol/ agua de mar esterilizada por autoclave) en intervalos de un minuto. Las muestras se mantuvieron durante una hora en las placas de Petri cerradas. Una parte de las mismas se homogeneizó en nitrógeno líquido y el resto se mantuvo en cultivo durante 48 h. Aquellas muestras no tratadas con MeJa pero mantenidas en cultivo bajo las mismas condiciones fueron empleadas como controles. Para verificar el efecto del MeJa, los talos frescos del alga fueron tratados con 20 mM de fenidona (Sigma Co.), inhibidor de la acción del MeJa. Las muestras fueron mantenidas durante 48 h en cultivo, tiempo requerido para la aparición de las estructuras reproductoras en tejido infértil.

Todo el material se aclimató previo a cada experimento durante 2 días en acuarios de 8 L de capacidad, y se mantuvo en cultivo con fotoperiodo 18 h L: 6 h O con una irradiancia de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, 100 mg de peso fresco de los talos previamente limpios fueron inmediatamente homogeneizados con nitrógeno líquido en morteros de cerámica estériles. La desinfección de los morteros se consiguió con lavados de etanol y secado en estufa a 65 °C. A continuación fueron mantenidos a -20 °C previo a uso.

Los talos homogeneizados fueron almacenados de manera individual en microtubos de 2 mL de capacidad, rotulados para su identificación por fecha y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de la extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al método CTAB (Murray y Thompson, 1980) según lo descrito por García-Jiménez y colaboradores, 2009. El método del CTAB se basa en las propiedades del detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) el cual induce la lisis del tejido vegetal y forma un complejo insoluble con las proteínas y polisacáridos, pero no precipita los ácidos nucleicos. De esta manera, y mediante lavados sucesivos con reactivos orgánicos, los polisacáridos de la pared vegetal, los compuestos fenólicos y otros contaminantes son eliminados de manera secuencial.

El *buffer* de extracción se compone por 100 mM TRIS-HCl (pH 8), 25 mM EDTA (pH 8), 2M NaCl, 2 % CTAB, 0,01 % PVPP, 0,1 % SDS y 2 %  $\beta$ -mercaptoetanol. Para su preparación, un volumen determinado del mismo es esterilizado en autoclave durante 20 min a 121 °C y en el momento previo a su uso, el  $\beta$ -mercaptoetanol es añadido para la inhibición de las proteasas.

Una vez añadido el *buffer*, las muestras se mantuvieron durante una hora en baño a 65 °C, mezclándolas suavemente por inversión aproximadamente cada 15 min. A continuación, un volumen de CIA (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1 v/v, mantenido en nevera) es añadido a cada microtubo, los cuales se homogeneizaron por inversión y y se centrifugaron durante 20 min a 4 °C y 3.000 rpm en una centrifuga Beckman Coulter. Se obtuvieron 3 fases claramente distinguibles: una fase orgánica superior, una fase intermedia con proteínas desnaturalizadas y una fase inferior acuosa. La fase orgánica conteniendo los ácidos nucleicos fue depositada en un microtubo nuevo. Este proceso de lavado con CIA, centrifugación y separación de la fase superior se repitió hasta que el sobrenadante se clarificó.

El protocolo continuó añadiendo 2/3 de alcohol isopropílico a -20 °C al volumen de sobrenadante y posteriormente, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad (22.000 x g) durante 30 min a 4 °C.

Esta separación resultó en la obtención de un precipitado o *pellet*, conteniendo el ADN. Así, el sobrenadante se retiró por inversión de los microtubos y el *pellet* fue lavado con 400  $\mu\text{L}$  de etanol (80% v/v, grado molecular) y centrifugado a máxima velocidad durante 5 min a 4 °C. Nuevamente, el sobrenadante es eliminado por inversión y los microtubos se mantuvieron en esta posición entre 5 y 10 min para favorecer la evaporación total de etanol, el cual puede actuar como inhibidor en posteriores reacciones de amplificación.

Finalmente, cada *pellet* fue resuspendido en 30  $\mu\text{L}$  de tampón TE (10 mM TRIS-HCl (pH 8) y 0,1 mM EDTA (pH 8), y reubicados en nuevos microtubos esterilizados de capacidad 1,5 mL y almacenados a 4 °C. La resuspensión en TE tiene como objetivo la rehidratación del *pellet* así como la inactivación de las DNAsas (Corkill y Rapley, 2008). De manera alternativa, el *pellet* fue resuspendido en agua mili-Q doblemente esterilizada.

### 3.1: Verificación de la integridad y calidad del ADN

La integridad del ADN genómico se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (1 %) con tampón TAE (1 %) a 75 V. El tampón TAE (TRIS-Acetato-EDTA) se prepara a partir de un stock 50x compuesto por 242 gr TRIS, 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8), en un volumen final de un litro con agua mili-Q doblemente esterilizada por autoclave. Paralelamente, se cuantificó la cantidad de ADN extraída usando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 530 con microceldillas para pequeños volúmenes. Para ello, las muestras se midieron a una longitud de onda de 260 nm (máximo de absorción de los ácidos nucleicos) y la pureza de las mismas se valoró midiendo la ratio 260/280 y 230/260.

Las muestras cuya concentración de ADN fue inferior a 60  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  y/o mostrasen *smear* aparente fueron descartadas.

## 4. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se partió del material previamente tratado, homogeneizado en nitrógeno líquido, almacenado en microtubos de 2 mL estériles y mantenido en congelador a -80 °C. El protocolo empleado es aquel indicado para el reactivo TRI (Sigma-Aldrich). Se parte de 100 mg de tejido algal al cual se añade 1 mL de TRI y se mantiene en hielo picado durante 15 min volteando suavemente cada microtubo y teniendo cuidado de que la baja temperatura no congele el reactivo y la muestra. Esto es importante ya que es necesario que



el tejido algal se mantenga en contacto con el reactivo, el cual es una mezcla de tiocianato de guanidinio y fenol en una solución monofase. El tiocianato de guanidinio es un compuesto químico con propiedades caotrópicas, el cual es comúnmente usado en la extracción de ácidos nucleicos ya que por un lado provoca la lisis de las células y, a la vez, evita que actúen las enzimas RNasa y DNasa mediante su desnaturalización; lo que favorece la obtención de ARN no contaminado.

Pasados los 15 min, las muestras se centrifugaron durante 10 min en una centrífuga Beckman-Coulter refrigerada a 4 °C, a 12.000 x g para eliminar el material insoluble, el cual precipita. A continuación, el sobrenadante con las proteínas y ácidos nucleicos es transferido a un microtubo estéril y se mantiene a temperatura ambiente durante 5 min para asegurar la disociación de complejos núcleo-proteicos. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo, grado molecular (Sigma Co.) por cada mL de reactivo TRI usado, se agitó vigorosamente para homogeneizar ambas soluciones y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min. Para continuar se centrifugó de nuevo a 4 °C y 12.000 x g durante 5 min. En ese punto, se pueden observar 3 fases diferenciadas en cada muestra, siendo la superior la que contiene el ARN. Cuidadosamente se traspasó dicha fase a un nuevo microtubo y se añadió un volumen de 500 µL de propanol, grado molecular (Sigma Co.), mezclando suavemente por inversión y manteniendo a temperatura ambiente durante 10 min. Para precipitar el ARN, las muestras se centrifugaron a 22.000 x g y 4 °C durante 20 min. Tras este paso, se eliminó el sobrenadante por inversión. A continuación, se añadió etanol grado molecular (75 %), se dió un ligero vortex y se centrifugó de nuevo a máxima velocidad durante 5 min. Finalmente, el etanol fue eliminado y el *pellet* se dejó secar sobre hielo picado entre 5 y 10 min aproximadamente para asegurar la total evaporación del etanol. El *pellet* fue resuspendido en 20 µl de tampón TE (10 mM TRIS-HCl (pH 8) y 0,5 mM EDTA (pH 8)) y tratado con 1 U mg<sup>-1</sup> de DNasa (Promega) para eliminar cualquier contaminación con ADN. De manera alternativa el *pellet* se puede solubilizar en agua mili-Q doblemente esterilizada.

#### **4.1: Verificación de la integridad y calidad del ARN**

Para comprobar la integridad y calidad del ARN se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa (1%) con tampón MSE (1%) y formaldehído (37 %) a 75 V. El tampón MSE se prepara a partir de una solución stock (10 %), la cual se compone de 0,2 M del compuesto MOPS, 50 mM de acetato de sodio (stock 3 M) y 10 mL de EDTA (stock 0,5 M). El pH se ajusta a 7 y se esteriliza por autoclave a 121 °C durante 20 min. Asimismo, se cuantificó la cantidad de ARN usando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 530 con microceldillas

para pequeños volúmenes. Para ello, las muestras se midieron a una longitud de onda de 260 nm (máximo de absorción de los ácidos nucleicos) y la pureza de las mismas se valoró midiendo el ratio 260/280 y 230/260.

## **5. Síntesis de ADNc mediante transcriptasa inversa**

Posteriormente a la obtención de ARN, este fue transcrito a ADNc mediante el kit comercial iScript-cDNA (BioRad, Hercules, CA, USA), el cual incluye oligonucleótidos y cebadores aleatorios. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador MyCycler™, (Biorad, Hercules, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 30 min, y 85 °C durante 5 min. El ADNc obtenido se mantuvo a - 20 °C hasta su uso.



# CAPÍTULO I



## Introducción

La importancia de las algas de cara a una producción biotecnológica a gran escala con fines comerciales (obtención de metabolitos o compuestos de interés) así como ecológicos (replacación de zonas potencialmente afectadas por la presión antropogénica) pone de manifiesto la necesidad de una investigación consciente y focalizada en los diferentes aspectos fisiológicos de estos seres vivos. En este sentido, el proceso reproductivo cobra especial importancia como motor fundamental de la continuidad del ciclo celular. Sin embargo, y ante la complejidad de los ciclos de vida existentes en algas parece necesario aunar el esfuerzo en obtener una mayor comprensión de los mismos e identificar de manera precisa cada una de sus fases.

El conocimiento de los factores que pueden controlar el crecimiento y desarrollo fue uno de los primeros pasos en el estudio a nivel de cultivo *in vitro*. Los trabajos previos destacaron la importancia que tiene la naturaleza del medio de cultivo (p.e: su gelificación) y la presencia de reguladores de crecimiento en los cultivos. En relación a la naturaleza física del medio, por ejemplo, se ha visto como el cultivo en medios gelificados con agar favorece la formación de 'callos' o masas morfogénicas compactas, en comparación con el cultivo en medio líquido (Fries, 1980; Saga *et al.*, 1982; Saga y Sakai, 1983; Polne-Fuller y Gibor, 1984; Polne-Fuller *et al.*, 1984; Robaina *et al.*, 1990). En relación a los reguladores de crecimiento, a veces conocidos como fitohormonas o inductores, presentan resultados controvertidos, pudiendo presentar un efecto regulador o modificador del comportamiento fisiológico normal de las algas, o no presentar efecto alguno. Mientras que la adición de ciertas sustancias como la kinetina al medio de cultivo no mostró efecto alguno sobre explantos de talos adultos de diferentes macroalgas (Robaina, 1988), este mismo compuesto sí afectó el desarrollo del tejido en estadíos jóvenes de la macroalga roja *Grateloupia imbricata* (Rodrigo, 1998). En este sentido, el efecto final de estas sustancias parece ser resultado de la acción combinada de diversos factores involucrados; principalmente las condiciones de cultivo y el tipo de tejido (Baweja *et al.*, 2009).

De manera cada vez más frecuente, la idea de que las macroalgas, a pesar de ser organismos multicelulares, son estructuras morfológicas simples con tejidos indiferenciados, en oposición a lo que ocurre en plantas superiores, está siendo revertida. En un mismo macrófito, se ha comprobado que la alternancia de fases (diploides y haploides), la organización y composición del tejido, así como el estadio de desarrollo (juvenil vs maduro, fértil vs infértil) tienen un peso considerable en la viabilidad del alga y determinan en gran medida los resultados obtenidos para diferentes estudios. Bajo esta premisa, parece evidente la necesidad

de un tejido competente, susceptible de ser estudiado bajo diferentes condiciones y cuya respuesta refleje los procesos fisiológicos subyacentes.

Diferentes aspectos del desarrollo fisiológico en algas, de manera específica el paso a una etapa reproductiva, proceso conocido como carposporogénesis, están regulados por numerosos factores exógenos (tales como la luz o la temperatura) (Dring, 1988; Bornette y Puijalon, 2011; Agrawal, 2012) y endógenos (normalmente los compuestos reguladores del desarrollo) (Catriona *et al.*, 1994; Tarakhovskaya *et al.*, 2006).

La investigación de los procesos ocurridos durante el ciclo de vida del alga roja *G. imbricata*, principalmente durante la carposporogénesis, ha representado uno de nuestros principales objetos de estudio en los últimos años. Inicialmente, el estudio de este proceso se abordó a partir del cultivo *in vitro* donde bajo diferentes condiciones de cultivo se observaron cambios fisiológicos durante la formación de las estructuras reproductivas; revelando toda una serie de modificaciones graduales tanto a nivel estructural como molecular (García-Jiménez *et al.*, 1998, 2009; Marián, 2002; Sacramento *et al.*, 2004, 2007) (Tabla 1).

En una primera etapa, se valoró el efecto de la presencia de diferentes sustancias inductoras incluidas en el medio de cultivo. Así, la adición exógena del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (una auxina sintética), el ácido giberélico ( $GA_3$ ), la benzil-amino-purina (BAP) (una citoquinina sintética), la kinetina, y las diferentes poliaminas (PAs) putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) respectivamente a cultivos axénicos *in vitro* de *carposporolings* de *G. imbricata*, en presencia o ausencia de una fuente de carbono como el glicerol puso de manifiesto que las sustancias reguladoras potenciaban el efecto morfogénico, en comparación a los controles, afectando significativamente el crecimiento, el desarrollo y la morfología (García-Jiménez *et al.*, 1998). Asimismo, los niveles endógenos de PAs, medidos en las fracciones libres y/o conjugadas, incrementaban, coincidiendo con el proceso de división celular y la generación de masas celulares de *G. imbricata* (Marián, 2002).

Sin embargo, de todos los reguladores estudiados fueron las PAs, la luz y más recientemente los compuestos de naturaleza volátil, el etileno (ET) y el metil jasmonato (MeJa), aquellos que han mostrado un papel más notorio en la afectación del proceso reproductivo a través de la inducción de las estructuras reproductoras.

Entre los factores externos, la luz ha sido uno de los inductores más estudiados en vegetales. De manera específica en algas, la luz incidente es uno de los parámetros principales que afecta su fisiología y como tal, la calidad de la misma, intensidad y relación entre las horas de luz y

oscuridad al que son sometidas determina en gran medida el crecimiento y desarrollo de las mismas. Estos organismos no sólo emplean la energía lumínica para realizar la fotosíntesis, sino que esta es requerida en todas las etapas del ciclo de vida, mediando desde la formación de esporas favoreciendo el proceso reproductivo, diferenciación de plastos, hasta la activación o represión de genes inducidos por luz (Brandt *et al.*, 1987; Doran y Cattolico, 1997; Soule, 2007). A su vez, el aprovechamiento de la luz es estrechamente regulado a través de un proceso de adaptación cromática o fotoaclimatación (Falkowski y La Roche, 1991), el cual incluye diversos mecanismos tanto de defensa como de optimización en el caso de situaciones de baja irradiancia.

El papel de la luz en la fisiología de las algas ha estado enfocado principalmente al cultivo de especies microalgales para la mejora de características específicas con algún interés comercial, p.e: incremento de biomasa u obtención de metabolitos secundarios tales como carotenoides (Csvina *et al.*, 2011; Al-Qasmi, 2012; Dautania y Singh, 2014), o su importancia en la sincronización o 'reloj circadiano' de eventos de naturaleza diversa. De manera general, se correlaciona una mayor síntesis de pigmentos a menores intensidades de luz (Tandeau de Marsac, 1983), aunque bajo condiciones de luz estresantes, cultivo bajo combinación de luz roja y azul, se puede inducir la acumulación de pigmentos como  $\beta$ -carotenos y luteína (Fu *et al.*, 2013). Asimismo, se ha visto como el tipo (espectro) de luz influye tanto en el crecimiento (Betancourt Fernández, 1997) como en la concentración de pigmentos; en este caso, se favorece una concentración superior relativa de los pigmentos tipo ficoeritrinas bajo luz verde, y aquellos como la ficocianina en luz roja (Tandeau de Marsac, 1983) en cianobacterias. Por otro lado, el reloj circadiano se considera un programa o ritmo interno el cual coincide con señales externas (luz) o momentos del día óptimos para el desarrollo o sincronización de procesos vitales. Este fenómeno fue primeramente identificado en el alga unicelular *Euglena* (Pohl, 1948) y posteriormente en el dinoflagelado *Gonyalux poliedra* (Sweeney y Hastings, 1957; von der Heyde *et al.*, 1992) demostrando que no sólo la luz, sino la temperatura, afecta también estos ciclos internos. Más aún, estos procesos han sido relacionados con la regulación de la expresión génica en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC7942 y mutantes de la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Suzuki y Johnson, 2001).

Los trabajos en macroalgas son más escasos y de naturaleza predominantemente ecológica. Estudios de campo han relacionado cambios estacionales en el crecimiento con valores de temperatura, salinidad e intensidad de la luz (Lüning, 1993). El cultivo en laboratorio de la especie de alga parda *Pterigophora californica*, bajo luz blanca y simulando las condiciones naturales de luz anuales, demostró la sincronización entre los ciclos de vida y la inducción de la formación de nuevos talos por el régimen diario de luz (Lüning, 1993). Este efecto se ha



observado de manera coincidente en las especies de macroalgas rojas *Porphyra umbilicalis*, *Porphyra leucosticta*, *Porphyra laciniata*, *Chondrus crispus*, *Corallina elongata*, *Plocamium cartilagineum* y *Palmaria palmata* bajo condiciones de laboratorio con diferentes combinaciones de luz, evidenciando que tanto la irradiancia como la composición espectral influyen en la composición pigmentaria, el metabolismo y crecimiento de estos organismos (López-Figueroa y Niell, 1989, 1990; López-Figueroa *et al.*, 1989, 1990; Algarra *et al.*, 1991; Lüning, 1992; Rüdiger y López-Figueroa, 1992; Tsekos *et al.*, 2002; Godínez-Ortega *et al.*, 2007). Otro ejemplo se observa en la macroalga roja *Halymenia floresii* donde la luz azul o roja estimula las ficoeritinas, la azul las ficocianinas y bajo luz blanca o verde se acumulan  $\alpha$ -caroteno y luteína (Godínez-Ortega *et al.*, 2007).

Asimismo, se ha visto que aspectos varios del proceso reproductivo también están influenciados por el cultivo bajo diferentes regímenes y condiciones de luz. Por ejemplo, en *Ulva fasciata* y *Gracilaria corticata* se observa como la exposición secuencial a luz UV-A y UV-B resulta en un descenso en el porcentaje de esporas liberadas, el cual es directamente proporcional al tiempo de exposición (Wiencke *et al.*, 2000; Ganesan *et al.*, 2010). Por otro lado, en 1984, Guiry y Cunningham percibieron como la inducción y formación de cistocarpos en *Gigartina acicularis* depende del fotoperiodo (FP); siendo necesarios cinco ciclos cortos (8 h L: 16 h O) para la aparición de ramas carpogoniales y cistocarpos y evidenciando cómo los ciclos cortos e intermedios (8 y 12 horas de luz respectivamente) son preferibles para la formación de estas estructuras. Previamente, también se observó como la liberación de esporas en la macroalga roja *Porphyra nereocystis* requiere un cultivo bajo fotoperiodo corto seguido por fotoperiodo largo durante 3 o 4 semanas, lo que indica una regulación dual por luz (Dickson y Waaland, 1985). De manera similar en *Porphyra* sp. se ha mostrado como longitudes de onda del espectro del rojo resultan más efectivas en la inducción del proceso reproductivo y este efecto puede ser revertido con longitudes en el rojo lejano; al igual que ocurre comúnmente en plantas superiores; sugiriendo por tanto la implicación de fotorreceptores tipo fitocromo.

De la misma manera, resultados similares fueron obtenidos por Rodrigo (1998), demostrando que la exposición a diferentes fotoperiodos es capaz de activar las primeras etapas de la tetraesporogénesis en talos jóvenes de *G. imbricata*. Mediante el diseño de diferentes situaciones experimentales y un estudio detallado de la diferenciación celular a nivel estructural y ultraestructural, se determinó que la aparición de las primeras estructuras reproductoras bien definidas tiene lugar a las 3 semanas de cultivo bajo un fotoperiodo corto o inductor (8 h L: 16 h O) y a las 4 semanas bajo fotoperiodo largo (12 h L: 12 h O) o control (18 L: 6 h O) (Tabla 1).



**Tabla 1: Principales sustancias o elementos reguladores estudiados en la macroalga roja *Grateloupia imbricata*.**

Grupo	Compuestos principales	Estadio del material	Efecto sobre el vegetal	Fuente
Auxinas	2,4-D (ácido diclorofenoxiacético)	<i>Sporeling</i>	Formación de callo.	Rodrigo, 1998.
	2,4-D + Glicerol	<i>Sporeling</i>	Estimulación del crecimiento organizado y morfogénesis.	
Citoquininas	BA (N <sup>6</sup> -benciladenina) Kin (Kinetina)	<i>Sporeling</i>	Inhibición del desarrollo.	Rodrigo, 1998.
	BA/Kin+Glicerol	<i>Sporeling</i>	Inhibición del desarrollo.	
Giberelinas	GA <sub>3</sub> (ácido giberélico)			Rodrigo, 1998.
	GA <sub>3</sub> +Glicerol		Inhibición del desarrollo.	
Poliaminas	Putrescina (Put) Espermidina (Spd) Espermina (Spm)	<i>Sporeling</i>	Formación de callo.	Rodrigo, 1998; Marián, 2002.
	PAs+Glicerol	<i>Sporeling</i>	Aumento en el crecimiento celular y morfogénesis.	
				Disminución paulatina de la actividad enzimática y la concentración endógena de PAs durante el desarrollo del cistocarpo. Sacramento <i>et al.</i> , 2004, 2007; García-Jiménez <i>et al.</i> , 2009.
			Disminución de la actividad transglutaminasa en condiciones hiposalinas.	García-Jiménez <i>et al.</i> , 2007.
Fotoperiodo (*)	Control (18 h L: 6 h O)	<i>Sporeling</i> Talos tetrasporofíticos	Ejes de crecimiento mayores y ramificación dicotómica, no generación de tetrasporangios.	Rodrigo, 1998. García-Jiménez, 1994.
	Corto (8 h L: 16 h O)	<i>Sporeling</i>	Ejes de crecimiento menores, no ramificaciones laterales; desarrollo de tetrasporangios (**).	Rodrigo, 1998.
	Medio (12 h L: 12 h O)	<i>Sporeling</i>	Ejes de crecimiento menores, ramificaciones laterales; desarrollo de tetrasporangios.	Rodrigo, 1998.

(\*) Se observaron diferencias significativas en el contenido pigmentario en función del estadio de desarrollo y el fotoperiodo aplicado. (\*\*): El fotoperiodo corto fue el más efectivo en la generación de las estructuras.

En relación a los reguladores del crecimiento o inductores (en inglés *elicitors*), estos hacen referencia a cualquier compuesto de origen biótico o abiótico capaz de alterar el metabolismo del organismo al que afecta. Así, la *elicitación* o inducción será el proceso por el cual estas sustancias modifican el patrón normal de crecimiento, desencadenando respuestas diversas en función del estímulo, la concentración del mismo y las vías de señalización implicadas.

Los inductores constituyen un grupo de sustancias de naturaleza muy variada, como los ya mencionados, compuestos nitrogenados como las poliaminas (PAs) (Tarakhovskaya *et al.*, 2006), volátiles como el etileno (ET) (Tomás-Barberán *et al.*, 1997; Poulev *et al.*, 2003) o el metil jasmonato (MeJa) (Hao *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015), hormonas como el ácido abscísico (ABA) (Finkelstein *et al.*, 2002; Tarakhovskaya *et al.*, 2006) o el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (Jones *et al.*, 2009; Abbasi *et al.*, 2012), entre otros. De manera general, los reguladores presentan un papel relevante en numerosos procesos vegetales y de manera particular, diferentes autores han estudiado su implicación en la reproducción en macroalgas (Rodrigo, 1998; Marián, 2002; García-Jiménez y Robaina, 2012; Uji *et al.*, 2016).

En este contexto de crecimiento y desarrollo, las PAs han mostrado un papel especialmente relevante como reguladores. Estos compuestos nitrogenados de bajo peso molecular se encuentran implicados en una amplia gama de procesos en las plantas superiores; que van desde el desarrollo floral, la maduración del polen, la germinación, la formación de la semilla o el desarrollo del fruto hasta el fomento de la proliferación celular o la resistencia a enfermedades (Montague *et al.*, 1979; Heimer y Mizrahi, 1982; Feirer *et al.*, 1984; Slocum y Galston, 1985; Kakkar y Rai, 1993; Pérez-Amador *et al.*, 1995; Walden *et al.*, 1997; Alabadí y Carbonell, 1998; Bais y Ravishankar, 2002; Kaur-Sawhney *et al.*, 2003).

Sin embargo, su relevancia en los organismos no se debe únicamente a su capacidad para influir el desarrollo, sino que la disposición de estas moléculas a formar conjugados tanto con compuestos de bajo peso molecular como con macromoléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos les confiere la capacidad de estabilizadores del ADN (Kaur-Sawhney *et al.*, 2003).

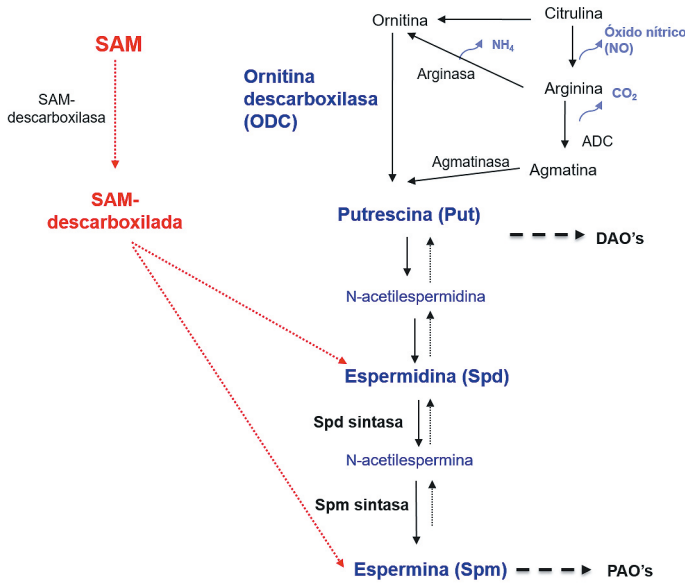
En algas, los primeros trabajos referentes a PAs se enfocaron en identificar estos compuestos y sus efectos bajo diferentes condiciones de cultivo y en diferentes grupos taxonómicos (Villanueva *et al.*, 1980; Hamana *et al.*, 1983, 1990). Desde un punto de vista

fisiológico, presentan efectos similares a los observados en plantas superiores, p.e: favorecen la división celular en *Chlorella* sp. (Cohen *et al.*, 1984), en *Ulva* sp. se encuentran involucradas en el transporte y absorción en el talo (Badini *et al.*, 1994) o en diversas respuestas regulatorias bajo diferentes condiciones de estrés (Lee y Chen, 1998; Li *et al.*, 2013). Igualmente en *Scenedesmus obliquus*, los cambios en la concentración de estas moléculas asociados al FP se han relacionado a su vez con el desarrollo del cloroplasto (Dörnemann *et al.*, 1996).

Asimismo, bajo condiciones de estrés, las concentraciones de PAs se ven afectadas y se modifican sus niveles endógenos para ofrecer una respuesta adecuada ante dichas situaciones (García-Jiménez *et al.*, 2007; Gill y Tuteja, 2010; Bitrián *et al.*, 2012). En general, se acepta que dichas respuestas deben entenderse como el resultado de un conjunto de interacciones de diferentes vías, con multitud de enzimas y genes involucrados, y no como resultado de una vía única (Bitrián *et al.*, 2012).

Por otro lado, en macroalgas rojas, se caracterizó el comportamiento de las PAs durante diferentes etapas del ciclo celular y especialmente durante la transición a la etapa reproductiva. En este sentido, se observó como la aplicación exógena de PAs en estadíos jóvenes de esporas inducía la formación de callo, promovía el aumento en el crecimiento celular y afectaba la morfogénesis. Asimismo, su aplicación sobre tejido infértil favorecía el desarrollo y la aparición de las estructuras reproductoras en *Gracilaria cornea* y *Grateloupia* sp. (Guzmán-Urióstegui *et al.*, 2002; Sacramento *et al.*, 2004), mostrando además la necesidad de la presencia de la poliamina espermina (Spm) para la liberación de las esporas en ambas macroalgas (Guzmán-Urióstegui *et al.*, 2002; Sacramento *et al.*, 2004, 2007).

Estas respuestas, observadas a partir del cultivo *in vitro*, se asociaron de manera directa a las actividades metabólicas de síntesis de las PAs, cuya ruta de síntesis comienza con la obtención de putrescina (Put) a partir de los aminoácidos ornitina y arginina. Esta reacción de descarboxilación es catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) y arginina descarboxilasa (ADC) respectivamente. Una vez sintetizada la Put, la adición secuencial de grupos aminopropilos derivados de la descarboxilación de la S-adenosil metionina (SAM) dará como resultado la obtención de espermidina (Spd) y finalmente espermina (Spm), dirigidas ambas reacciones por la enzima Spd sintasa y Spm sintasa respectivamente. A su vez, los niveles de Spd y Spm están bajo el control de las diamino oxidasas (DAOs) y poliamino oxidasas (PAOs) (Fig. 1).



**Figura 1: Ruta de síntesis de las poliaminas: DAO: diamino oxidasa; PAO: poliamino oxidasa; SAM: S-adenosil-metionina.**

En plantas superiores, la determinación de las enzimas principales de la síntesis de poliaminas, ODC y ADC, se correlaciona con eventos fisiológicos característicos. Así de manera general, la ODC está vinculada a procesos de crecimiento y desarrollo, mientras que la ADC lo hace de manera predominante bajo situaciones de estrés (Bouchereau *et al.*, 1999). En este sentido, por ejemplo, en *Arabidopsis sp.* se ha visto como el gen que codifica para la ADC (*AtADC2*) causa la acumulación de Put en respuesta a estrés salino (Urano *et al.*, 2004).

La ruta de la ODC ha sido igualmente identificada como predominante en diferentes algas y su actividad se ha asociado a procesos de división celular en tejidos jóvenes o en desarrollo, no maduros (Villanueva *et al.*, 1980; Cohen *et al.*, 1982). De manera similar, en macroalgas rojas, la determinación *in vitro* de las actividades enzimáticas de las principales enzimas de la ruta de síntesis de las PAs, ODC y ADC, así como de las enzimas catabólicas relacionadas DAO y PAO puso de manifiesto que la síntesis de PAs ocurría de manera principal vía ODC (Sacramento *et al.*, 2004). Los trabajos con material infértil (sin estructuras reproductoras) y fértil (con cistocarpos) en *G. imbricata* revelaron una correlación negativa entre la concentración endógena de PAs y el grado de desarrollo del tejido. Se observó un incremento en las concentraciones internas de manera diferencial, siendo en todos los casos superior para el tejido infértil y disminuyendo a medida que el cistocarpo se desarrolla. Este aumento en las PAs para los talos infértiles se correlacionaba con niveles superiores en la actividad enzimática de la ODC, mientras que una vez el cistocarpo se hace visible, tanto la actividad

enzimática como los niveles de PAs decaen abruptamente (Sacramento *et al.*, 2004, 2007; García-Jiménez *et al.*, 2009).

Un hecho a destacar es que, aunque esta correlación es mantenida, los valores enzimáticos absolutos difieren en gran medida, presentando alta variabilidad. En concreto, en *G. imbricata* es difícil considerar más allá de dos estadios reproductivos, basados en la presencia y ausencia de cistocarpos, de ahí que las actividades enzimáticas sigan la misma tendencia pero en datos absolutos sea imposible analizar, y por tanto se trabaje en rangos.

Asimismo, el empleo de diferentes inhibidores (ciclohexilamina: CHA y dicitclohexilamina: DCHA) mostró que sin ser los inhibidores específicos, las rutas de síntesis se veían alteradas y en consecuencia, el comportamiento fisiológico (Sacramento *et al.*, 2007).

Por el contrario, el comportamiento exhibido por las enzimas PAO y DAO muestra un máximo coincidente con la aparición del cistocarpo, lo que indica una mayor actividad oxidasa como resultado de una mayor acumulación de PAs y el desarrollo de las estructuras (Sacramento *et al.*, 2007).

De estos trabajos se pueden concluir dos premisas: las PAs están directamente relacionadas con las actividades enzimáticas de síntesis y degradación y este resultado es consecuencia del proceso de formación de las estructuras reproductoras y, por otro lado, la determinación de las actividades enzimáticas en algas es complicada debido a la escasez de tejido metabólicamente activo derivado de su estructura morfológica y la no existencia de fases visibles entre el estadio infértil y fértil.

En 2009, la identificación de la secuencia del gen *ODC* en *G. imbricata* (*GiODC*, FJ 223132) mediante paseo cromosómico permitió la caracterización y monitorización de su expresión durante las etapas fértiles e infértiles de esta macroalga (García-Jiménez *et al.*, 2009) y ahondó en los procesos reproductivos de las macroalgas rojas. Al respecto, la determinación de un gen candidato de la reproducción en algas rojas el cual sirva como marcador que nos ‘alerte’ de los cambios que tienen lugar a nivel molecular se hace necesaria.

## Gen candidato en vegetales

El concepto de gen candidato ha sido ampliamente empleado en plantas superiores para la identificación de eventos diversos (Pflieger *et al.*, 2001). Por ejemplo, en el garbanzo se identificaron cinco genes implicados en la regulación de la altura de la planta y fueron propuestos como genes candidatos de este proceso (Kujur *et al.*, 2016). En arroz, el gen *LP1* se expuso

como marcador para la longitud de la panícula (Liu *et al.*, 2016) y en café se determinó la expresión de 38 genes en respuesta a procesos de sequía (Mofatto *et al.*, 2016).

Por otro lado en algas, varios genes se han propuestos como candidatos en la regulación de diferentes procesos fisiológicos tanto para especies de microalgas (Mühlroth *et al.*, 2013) como de macroalgas (Cock *et al.*, 2010; Collén *et al.*, 2013, 2014; Souza de Oliveira *et al.*, 2015). Por ejemplo, en las macroalgas rojas *Laurencia dendroidea* se han identificado genes candidatos relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios que codifican la giberelina-2-oxidasa y 20 -oxidasa, mientras que la secuenciación del genoma de *Chondrus crispus* ha permitido la determinación de grupos de genes relacionados con defensa y estrés entre otros. También en algunas macroalgas pardas como *Ectocarpus siliculosus* se han revelado genes que codifican la enzima aleno oxidasa ciclasa (AOC) y la aleno oxidasa sintasa (AOS), las cuales están implicada en la ruta de síntesis del ácido jasmónico. También en esta especie, el gen *OUROBOROS* se comporta como uno de los factores principales controlando la transición de la fase gametofítica a la esporofítica (Coelho *et al.*, 2011) y el gen *ETOILE* afecta diversos aspectos del desarrollo (Le Bail *et al.*, 2011).

En macroalgas rojas y relacionados con el proceso reproductivo, diversos autores han propuesto una serie de genes como marcadores del mismo (Tabla 2).

**Tabla 2: Genes propuestos como candidatos en la reproducción de las algas rojas.**

Organismo	Gen	Características	Referencias
<i>Porphyra purpurea</i>	Lipooxigenasa, proteína de unión y una quimotripsina Factor de elongación ( <i>EF-1<sup>a</sup></i> , <i>EF</i> )	Expresión diferencial en función del tejido (esporofito y carposporofito)	Liu y Reith, 1994; Liu <i>et al.</i> , 1996a, b, c
<i>Porphyra yezoensis</i>	Bombas de sodio ( <i>PyKPA1</i> , <i>PyKPA2</i> )	Expresión diferencial en función del tejido (esporofito y carposporofito)	Uji <i>et al.</i> , 2012, 2013
	Genoma de <i>P.yezoensis</i>	1% de los genes asociados a reproducción	Nakamura <i>et al.</i> , 2013
<i>Gracilariopsis andersonii</i>		Sobreexpresión de genes en tejido (carposporofito)	Kamiya <i>et al.</i> , 2011
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	Proteína de estrés tipo <i>hsp90</i> ( <i>GMF-01</i> )	Sobreexpresión en el tejido del gametofito femenino	Chen <i>et al.</i> , 2011 Ren <i>et al.</i> , 2009
	Ubiquitin gene		
<i>Griffithsia japónica</i>	<i>GjFP-1</i>	Diferenciación del gametofito femenino	Lee <i>et al.</i> , 1998

Sin embargo, estos trabajos deben ser cuidadosamente revisados y analizados, ya que la transición a una etapa reproductiva implica cambios mucho más complejos y a diferentes niveles fisiológicos, resultado todos ellos de complejas interacciones producidas como respuesta a estímulos de naturaleza diversa. Es por tanto asumible que una batería de genes diversos se vea afectada (sobreexpresada y/o inhibida) durante el mismo, p.e: genes de respuesta a estrés, de elongación o senescencia entre otros y en los diferentes tejidos, tanto si el vegetal se encuentra en un estado reproductivo como vegetativo. No obstante, este hecho no significa necesariamente que dicha expresión sea resultado directo del proceso reproductivo sino más bien de alguna de las vías de señalización que pueden estar actuando de manera paralela, p.e: como la respuesta a estrés.

En este sentido, se identificaron dos genes de elongación (*EF* y *EF-1a*) los cuales se expresaban de manera diferencial en las diferentes fases del alga *Porphyra purpurea*. Mientras que *EF* se expresaba indistintamente en el esporofito y el gametofito, *EF-1a* sólo lo hacía en el esporofito (Liu *et al.*, 1996a), sugiriendo un papel fundamental del mismo en el proceso de desarrollo. De manera similar, una lipooxigenasa, una proteína de unión y una quimotripsina fueron también propuestas como elementos involucrados en el proceso de desarrollo reproductivo (Liu y Reith, 1994; Liu *et al.*, 1996a,b,c). No obstante, las enzimas lipooxigenasas están involucradas en la oxidación de los lípidos, las quimotripsinas son enzimas proteolíticas y los factores de elongación son proteínas involucradas en los procesos de crecimiento celular. Por tanto, las diferencias detectadas en la expresión de dichos genes podrían deberse a una cuestión estructural del tejido derivada de las cualidades específicas del gametofito y el esporofito.

De manera similar, dos genes codificantes de bombas de sodio encargados del mantenimiento de la homeostasis en la célula, *PyKPA1* y *PyKPA2*, aparecen también en el tejido gametofítico y en el esporofítico respectivamente y de manera diferencial. Bajo condiciones de descenso de temperatura se registra un aumento de transcritos de *PyKPA1* y *PyKPA2* lo que los autores han relacionado con una aclimatación necesaria para el desarrollo del gametofito, el cual ocurre en la época invernal. Estudios posteriores mostraron que esta expresión es dependiente de elementos específicos localizados en regiones concretas del promotor (Uji *et al.*, 2012, 2013).

En el alga roja *Griffithsia japonica* (Lee *et al.*, 1998), tras un *screening* de 10.000 clones se identificó *GjFP-1* un gen correspondiente a una proteína de estrés *hsp90*, el cual se expresaba de manera predominante en el gametofito femenino. Este grupo de proteínas son sintetizadas por la célula como respuesta ante cualquier condición estresante, por lo que la sobreexpresión del mismo podría ser consecuencia de la aclimatación del material vegetal tras su recolección y manipulación en cultivo.

En los últimos años, y gracias a los avances en la metodología molecular, la identificación de genes se ha realizado a partir de las técnicas de secuenciación masiva e hibridación subtractiva (SSH). En *Gracilaria andersonii* mediante SSH se identificaron genes expresados de manera específica en el carpoesporofito en esta fase del ciclo de vida, relacionándose uno de ellos con la codificación de la enzima glutatión-S- transferasa (GST) de *Chondrus crispus*, mientras que el resto de secuencias codificaban proteínas de función desconocida. A través del empleo de la misma metodología, Chen y colaboradores, 2011, identificaron *GMF-01*, expresado de manera única en el gametofito femenino de *Gracilaria lemaneiformis*, aunque la secuencia proteínica no presentaba similitud con ninguna proteína conocida por lo que no se pudo concluir su función ni que esta sea específica de tejido reproductivo de algas rojas. De la misma manera, Ren y colaboradores (2006, 2009) emplearon la técnica de SSH para la determinación y seguimiento en la expresión de varios genes y detectar diferencias entre las fases gametofíticas y tetraesporofíticas en el alga roja *Gracilariopsis lemaneiformis*. Los resultados mostraron varios genes homólogos de enzimas implicados en rutas metabólicas relacionadas con el desarrollo, transporte vesicular o crecimiento, sugiriendo su implicación en la diferenciación de fases del alga. No obstante, muchas de las secuencias evaluadas no presentaron similitud con secuencias actualmente depositadas, por lo que su función sigue siendo desconocida.

En 2013, Nakamura y colaboradores secuenciaron el genoma de *Pyropia yezoensis* e identificaron 10.327 genes de los cuales, estimaron que el 1% presentaba funciones relacionadas con el proceso reproductivo. Para inferir la función *in silico* de cada gen emplearon el programa BlastP (e value <1e-5) y la base de datos Gene Ontology.

Una aproximación similar ha sido establecida para *Chondrus crispus* (Collén *et al.*, 2013, 2014). La secuenciación de su genoma y la anotación de 9.606 genes ha permitido la descripción de genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, oxilipinas o compuestos halogenados. A destacar son los resultados mostrados como respuesta a condiciones estresantes, p.e: variaciones de salinidad, altas temperaturas o tratamiento con MeJa, donde se ha visto expresión diferencial de numerosos genes correspondientes a proteínas de estrés o enzimas antioxidantes, tales como la GSTs, la ascorbato peroxidasa (APX) o la superóxido dismutasa (SOD) entre otras (Collén *et al.*, 2006, 2007).

En este sentido por tanto, se observa como diversos grupos de genes son activados o reprimidos durante el ciclo de vida de estos organismos. Mas aún, si consideramos que las algas se encuentran en medios sumamente cambiantes debido a las diferentes condiciones ambientales, donde las variaciones de salinidad, temperatura u horas de luz suponen la



dinámica constante, los organismos deben ser capaces de responder a los mismos de una manera rápida y eficiente. Consecuentemente, estas modificaciones, como resultado de una rápida aclimatación, serán reflejadas a nivel molecular en su transcriptoma. No obstante y a pesar de que los cambios a nivel fisiológico y molecular están estrechamente relacionados, establecer las bases por las que estas relaciones causa-efecto ocurren, es altamente complicado y más aún, asociarlos de manera directa a un proceso fisiológico determinado, en este caso la reproducción (García-Jiménez y Robaina, 2017, *en prensa*).

Comúnmente, este tipo de respuesta ante la acción de estímulos varios ha sido ampliamente identificada en diferentes algas y hongos (Fu *et al.*, 2014; Gerken *et al.*, 2015; Velez *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2016), diferenciándose entre lo que sería una respuesta de aclimatación, relativamente rápida y normalmente asociada a variaciones del medio, frente a una de adaptación, más lenta y con cambios fisiológicos subyacentes más complejos como ocurre en las plantas superiores (Whitehead, 2012).

En algas, la aclimatación del transcriptoma en respuesta a las condiciones del entorno es un proceso común el cual ha sido observado en diferentes especies. Así por ejemplo, se ha visto como en *Prochlorococcus* sp. existe expresión diferencial de genes en respuesta a la adición de hierro al medio de cultivo sugiriendo la activación de los mismos como mecanismo de protección (Thompson *et al.*, 2011); *Emiliana huxleyi* es capaz de responder a situaciones limitantes de sulfato mediante la sobreexpresión de diversos genes de la ruta de síntesis de carbohidratos y ácidos grasos (Bochenek *et al.*, 2013) y *Prymnesium parvum* muestra sobreexpresión de genes relacionados con el metabolismo del acetato y el transporte vesicular y transmembrana tras modificaciones en la salinidad del medio (Talarski *et al.*, 2016). También en algunas macroalgas como *Ectocarpus siliculosus*, ocurre esta regulación diferencial de genes presentes en varias rutas metabólicas en respuesta a múltiples situaciones de estrés, tales como modificaciones en salinidad o presencia de metales (Dittami *et al.*, 2009, 2011, 2012; Ritter *et al.*, 2010, 2014; Tonon *et al.*, 2011).

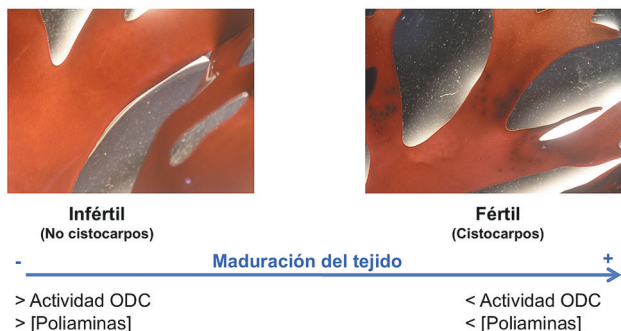
En consecuencia, parece evidente que la expresión o silenciamiento de múltiples genes ocurre de manera constante en los organismos. Es asumible que una batería de genes diversos se vea afectada durante un proceso, p.e: genes de respuesta a estrés, de elongación o senescencia entre otros y en los diferentes tejidos, tanto si el vegetal se encuentra en un estado reproductivo como vegetativo. No obstante y como se ha señalado previamente, este hecho no significa necesariamente que dicha expresión sea resultado directo del proceso reproductivo sino más bien de alguna de las vías de señalización que pueden estar actuando de manera paralela.

Por tanto es imprescindible a la hora de designar un gen como candidato de un evento, como es la reproducción, que este sea consciente como marcador del proceso fisiológico y establecer un diseño y metodología experimental adecuada que nos ayude. Más aún, es necesario que dicho gen presente capacidad señalizadora durante el proceso estudiado y bajo las diferentes condiciones de estudio planteadas.

## **ODC como gen candidato en la reproducción de las algas rojas**

En algas rojas no existían evidencias previas de un gen candidato en la reproducción. No obstante, los estudios del grupo de investigación mostraron que el gen *ODC* podría verse implicado y afectado a nivel de expresión durante la carposporogénesis, por lo que se presentaba como un candidato bastante probable. En 2009, la identificación de la secuencia del gen *ODC* mediante paseo cromosómico (*GiODC*, FJ 223132) permitió la caracterización y monitorización de su expresión durante las etapas fértiles e infértiles de *G. imbricata* (García-Jiménez *et al.*, 2009).

Dos aproximaciones fueron planteadas para el establecimiento de *ODC* como gen candidato: la primera, mediante PCR cuantitativa y a través del fluoróforo Syber Green y sonda de hidrólisis, demostró que existía expresión diferencial en función del tejido (zona basal del talo frente a la apical) y el grado de desarrollo o maduración del mismo (presencia o ausencia de cistocarpos). La segunda aproximación, con el empleo de la técnica de hibridación *in situ* (ISH) confirmó expresión diferencial coincidente con las actividades enzimáticas medidas previamente para la ODC y los niveles endógenos de las PAs. Esto es, la zona basal del talo, donde no se encuentra la estructura reproductiva, presenta niveles superiores de expresión de *GiODC* en comparación con la zona apical con cistocarpos. Asimismo, los niveles de expresión son máximos en tejido infértil, coincidiendo con elevados niveles de actividad enzimática y concentración de PAs, e invariablemente disminuyen según el cistocarpo madura y se hace visible (García-Jiménez *et al.*, 2009) (Fig. 2).



**Fig 2: Esquema de transición desde un estado infértil a fértil en tejido de *Grateloupia imbricata*.**

Este claro patrón en el comportamiento génico durante todo el proceso reproductivo y bajo diferentes condiciones experimentales, parece señalar de manera muy concreta una relación directa entre *GiODC* y la transición a una etapa reproductiva en *G. imbricata*. Por todo ello, el gen *GiODC* se propuso como candidato de la regulación del proceso reproductivo (García-Jiménez y Robaina, 2015, 2017).

## Regulación génica de *GiODC*

La regulación génica comprende diferentes etapas que hacen de este proceso un interesante objeto de estudio tanto desde un punto de vista fisiológico como biotecnológico, el cual nos ofrece la posibilidad de obtener un mayor conocimiento en diferentes ámbitos.

Dicha regulación es extremadamente compleja y comprende multitud de componentes, los cuales son a su vez dependientes tanto de factores internos (p.e: el estado fisiológico del vegetal), externos (factores bióticos o abióticos), así como de todas las interacciones que se establecen entre ellos mismos. La regulación puede llevarse a cabo mediante la remodelación y/o cambios en la estructura de la cromatina; la transcripción o síntesis del transcrito primario; el procesamiento post-transcripcional del ARN mensajero (mARN); la degradación del mARN; la traducción o síntesis de proteínas; y la modificación y/o degradación de la propia proteína. De entre todos ellos, la regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional son *a priori* los más determinantes.

El proceso de transcripción supone toda una serie de complejos mecanismos asociados en los cuales la información contenida en el ADN es transcrita a una molécula de ARN mensajero que mantiene dicha información y posibilita la obtención de diferentes proteínas. En general se acepta que este nivel de regulación es primeramente determinado por las interacciones entre unas proteínas conocidas como factores de transcripción (FTs) y el ADN. Comúnmente, se distinguen cuatro grupos proteicos (Riechmann, 2002):

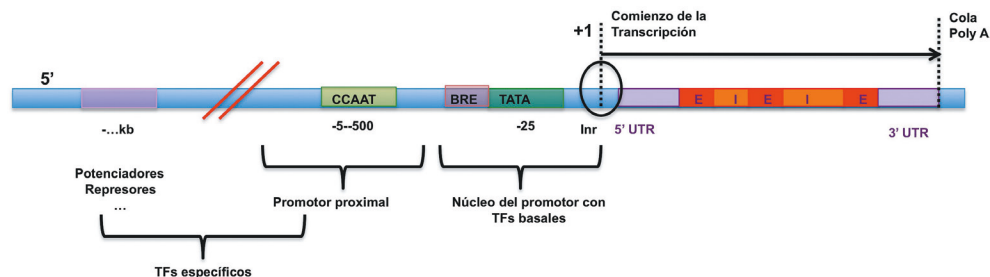
- los FTs ‘básicos o basales’ y sus elementos asociados (conocidos comúnmente como ‘Factores de Transcripción Generales o GFTs’),
- los FTs con capacidad para unirse a secuencias conservadas y específicas del ADN (normalmente denominados FTs ‘generales o comunes’),
- co-activadores y cofactores, y
- proteínas relacionadas con el empaquetamiento de la cromatina.

En la siguiente tabla (Tabla 3) se detallan los diferentes elementos proteicos, su función general y el motivo que lo caracteriza.

**Tabla 3: Diferentes elementos reguladores a nivel transcripcional. UPE: *Upstream Promoter Element*, DPE: *Downstream Promoter Element*, BRE: *B-recognition element*, Inr: Iniciadores.**

Elementos reguladores	Elemento/motivo	Función	Referencias
FTs basales y elementos asociados	TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFIIF y TFIIH	Formación del <i>PIC</i> (Complejo de pre-iniciación de la transcripción) y el correcto comienzo de la transcripción.	Riechmann, 2002.
Cofactores, co-activadores			
FTs 'generales o comunes'	Proteínas asociadas a la transcripción ( <i>TAPs</i> )	Capacidad para unirse a elementos reguladores del ADN de manera específica.	Riechmann <i>et al.</i> , 2000; Riechmann, 2002; Riaño-Pachón <i>et al.</i> , 2008; Lang <i>et al.</i> , 2010; Zhuang <i>et al.</i> , 2011.
	Reguladores transcripcionales ( <i>TRs</i> )	Funciones reguladoras indirectas.	
	Proteínas putativas asociadas a la transcripción ('putative <i>TAPs</i> ')		
Proteínas asociadas al estado de la cromatina			Riechmann, 2002.
Promotor	Caja TATA Caja CCAAT Islas CpG	Secuencias reguladoras que permiten el ensamblaje de la ARN polimerasa II y el correcto acoplamiento de los diferentes GFTs necesarios para el inicio de la transcripción.	Klug y Cummings, 1999; Carninci <i>et al.</i> , 2006; Montes Resano, 2012; Barret <i>et al.</i> , 2013.
	Elementos potenciadores: <i>UPE</i> , <i>DPE</i> , <i>BRE</i> ; iniciadores: <i>Inr</i>		Juven-Gershon <i>et al.</i> , 2008.

En la figura 3, se muestra un sencillo esquema de la estructura de un gen y la localización de estos TFs.



**Figura 3: Esquema de algunos de los diferentes elementos reguladores a nivel transcripcional. 'E' denomina 'exón' e 'I', intrón.**

En general, las regiones situadas en los extremos (5' y 3') de la zona codificante de los genes son conocidas como regiones UTR (*Untranslated Regions*). Inicialmente, fueron consideradas 'ADN basura', no obstante su implicación en la regulación de genes implicados en numerosos procesos celulares como respuesta ante diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, procesos de desarrollo y diferenciación celular, metabolismo o defensa (Molina y Grotewold, 2005) las han convertido en objetivo interesante de estudio. Aunque tanto la 5' UTR como la 3' UTR presentan capacidad reguladora, de manera general la 5' ha sido asociada con la etapa de iniciación en la traducción mientras que la 3' parece afectar en mayor medida la estabilidad del transcrito y su degradación (Day y Tuite, 1998).

De manera específica, la 5' UTR se caracteriza por la presencia de una caperuza en el extremo 5' (*cap-5*) compuesta por un nucleótido de guanina ligado al ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5' (Banerjee, 1980). No se conoce con seguridad la función de esta caperuza pero se ha descrito su implicación en la estabilización del ARNm (Meyer *et al.*, 2004) así como sugerido un papel determinante en la prevención de proteínas anómalas, ya que imposibilita la formación del PIC (Complejo de Pre-Iniciación) cuando no concurren todos los factores o elementos de iniciación (eIF) necesarios (Mitchell *et al.*, 2010).

Asimismo, la estructura y composición nucleotídica de esta secuencia parece desempeñar un papel clave a la hora de la regulación a decir de las marcadas diferencias entre los genes constitutivos y los regulados (Ganapathi *et al.*, 2005). En este sentido, se ha comprobado que la presencia de elementos, secuencias o estructuras en la 5' UTR es determinante para el comienzo de la traducción ya que pueden imposibilitar la unión directa con la subunidad 40S o con proteínas reguladoras de unión (Day y Tuite, 1998).

El estudio de estas regiones y de manera paralela los elementos presentes en las mismas, especialmente los FTs, ha puesto de manifiesto que estas proteínas constituyen una parte considerable del genoma de diversos organismos eucariotas. Así en la planta modelo *Arabidopsis* sp. se ha observado que en torno al 5% del genoma contiene la información necesaria para la codificación de más de 1.500 FTs, de los cuales, el 45% está englobado en familias presentes únicamente en plantas.

Sin entrar en mucho detalle, la importancia funcional de estos elementos radica por un lado en que mediante la acción combinada de los mismos tiene lugar la correcta formación del PIC y por tanto el inicio de la síntesis del transcrito primario; y por otro lado, la existencia de los FTs con afinidad por secuencias específicas de ADN situadas en posiciones variables con respecto a los genes que regulan permite controlar la transcripción mediante la activación y/o inhibición de los mismos. La activación y/o silenciamiento de un gen depende en gran medida del tipo de motivo presente en estos elementos y la naturaleza de los mismos (Riechmann *et al.*, 2000; Riechmann, 2002; Riaño-Pachón *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2010; Zhuang *et al.* 2011).

Una vez el transcrito primario (pre-mRNA) ha sido sintetizado, este sufrirá diversos mecanismos previos a convertirse en un transcrito maduro, ser exportado al citoplasma y entrar al complejo ribosomal. En esta etapa ocurren los mecanismos de *splicing* o 'ajuste' por los cuales los intrones son escindidos y se produce la unión de los exones mediado por las proteínas activadoras o silenciadoras del *splicing*. Estas proteínas pueden generar diferentes transcritos maduros a partir de un único pre-mARN como resultado del proceso de *splicing* alternativo (Watson *et al.*, 2005).

En este paso previo a la traducción es donde las regiones UTR ejercen su papel regulador, principalmente por las interacciones entre el ARN y las proteínas, las cuales afectan la estabilidad del transcrito primario pudiendo aumentar o disminuir su vida media, lo que como consecuencia determinará el nivel de expresión génica.

Incontables casos de este tipo de regulación existen en diferentes organismos. Por ejemplo, en *Drosophila* sp., la proteína Bicoid dirige el desarrollo embrionario a través de la regulación transcripcional así como mediante la interacción con el transcrito de Caudal, otra proteína, inhibiendo de esta manera su traducción e impidiendo por tanto su acumulación mediante el control post-transcripcional (Niessing *et al.*, 2002).

En el caso particular del gen *ODC*, existen pocos trabajos sobre su regulación en vegetales. Por el contrario, y debido a la importancia de este gen en los procesos de proliferación celular ha sido ampliamente estudiado en animales (López Contreras, 2008). En referencia, se ha visto cómo en

células de mamífero el gen *ODC* puede ser regulado a nivel transcripcional (factores que afectan su expresión o presencia de elementos en sus regiones promotoras), a nivel pos-transcripcional y previo a la traducción (a través del control que ejerce la región 5' UTR) y finalmente post-traducciona (degradación del proteosoma 26 S sin necesidad de ser ubiquitinada (Bercovich *et al.*, 1989) o mediante la unión a antizimas. En este caso, la antizima se une a ODC y es trasladada al proteosoma, donde posteriormente es degradada (Hayashi *et al.*, 1996; Pegg, 2006).

De manera específica, en la macroalga roja *G. imbricata*, los únicos datos disponibles son resultado de un estudio en el cual los autores mostraron que una elevada concentración de Spm actuaba como control negativo de ODC, manteniendo en un nivel adecuado su actividad enzimática (Sacramento *et al.*, 2007). Tras diferentes ensayos con una preparación semipurificada de esta enzima, se observó como la misma era capaz de mantenerse activa durante 20 días, siendo posteriormente inhibida por tratamiento con difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor específico de ODC, y por Spm añadida de manera exógena. Los datos mostraron que la inhibición mediada por Spm era muy superior (hasta el 90%), lo que parece indicar una autoregulación por parte de enzimas de la misma ruta biosintética. En este sentido, pocos datos existen a nivel molecular que nos permitan aseverar las vías, factores o elementos implicados; sin embargo, las evidencias sugieren regulación a diferentes niveles, estableciendo un amplio marco para su investigación.

En consecuencia, parece evidente que la expresión diferencial de un gen es el resultado final de una multitud de procesos combinados y por tanto, el estudio de ODC en *G. imbricata* debe abordar por un lado la estructuración y composición de su región 5' y por otro, ahondar en el conocimiento de los FTs o elementos localizados en la misma. Todo ello supone un paso fundamental para entender en primer lugar el proceso de regulación génica y su implicación en los eventos ocurridos durante la carposporogénesis, y en última instancia cómo controlar su expresión.

## Hipótesis y objetivos del capítulo

El conocimiento de la estructura molecular de un gen parece requisito indispensable para descifrar las complejas redes de regulación que afectan su expresión y determinan un proceso fisiológico determinado. Bajo esta premisa y para obtener un mayor conocimiento sobre las vías de regulación moleculares implicadas en el proceso reproductivo en la macroalga roja *G. imbricata*, el gen *ODC*, cuya expresión varía de manera diferencial durante dicho proceso, se presenta como gen candidato para la determinación del mismo. Por ello, se plantean como objetivos específicos:

- i) la obtención de parte de la región 5' del gen de la ornitina descarboxilasa en el alga roja *Grateloupia imbricata* (*GiODC*) mediante la implementación de la técnica de amplificación inversa y de acuerdo a dos enfoques diferentes;
- ii) el análisis de la secuencia 5' para ahondar en su estructura e identificar posibles elementos reguladores contenidos en la misma;
- iii) la clasificación de los elementos identificados en base a su función biológica y familia o superfamilia que los engloba y una revisión de aquellos con potencial regulador sobre *GiODC*;
- iv) comparación de diferentes regiones 5' UTR correspondientes a genes *ODC* en diferentes organismos y generación de un árbol filogenético de dichas secuencias con el objetivo de observar las posibles diferencias y/o similitudes entre diferentes reinos y,
- v) estudios de expresión génica a tiempo real, mediante RT-qPCR, bajo diferentes tratamientos de inducción de la reproducción.



## Material y Métodos

### 1. Paseo cromosómico e IPCR

A partir del fragmento del gen *ODC*, se pretende ampliar la zona 5' del mismo para la identificación y el estudio de los factores presentes. Para ello se desarrolla el método de paseo cromosómico o *chromosome walking*, el cual ha sido comúnmente empleado en el mapeo físico y el clonaje posicional. El paseo cromosómico consiste en la obtención de la secuencia nucleotídica adyacente a una región de ADN conocida. De manera resumida, se diseñan cebadores en dirección externa al fragmento mencionado, el cual es digerido y mediante sucesivas amplificaciones se obtienen secuencias adyacentes cuyo solapamiento permitirá la reconstrucción de la secuencia anterior y posterior.

De acuerdo a estas premisas, y a partir de la secuencia de 1.861 bp correspondiente al gen de *G. imbricata* (Acc. Num: FJ FJ223132) se seleccionaron los primeros 500 nt y se desarrollaron dos procedimientos para el paseo cromosómico con algunas variaciones entre ellos, las cuales se describen a continuación.

#### Aproximación 1

La primera aproximación, de acuerdo a Ochman y colaboradores, 1988, consiste en diseñar cebadores dentro de los primeros 500 nt situados hacia el extremo 5' del gen *GiODC* y posteriormente emplear enzimas de restricción cuyo sitio de corte se encuentre fuera de la misma lo que generará fragmentos genómicos de distinto tamaño. Para el diseño de cebadores se empleó el software Primer 3 (<http://www.bioinfo.ut.ee/primer3/>) (empleando los parámetros por defecto). Se obtuvieron ocho cebadores: cuatro con orientación *forward* (iPCRODCf1, iPCRODCf2, iPCRODCf3, iPCRODCf4) y cuatro con orientación *reverse* (iPCRODCr1, iPCRODCr2, iPCRODCr3, iPCRODCr4) (Tabla 4). La localización de los cebadores en la secuencia se muestra en la figura 4.

**Tabla 4: Cebadores diseñados con el programa Primer 3 para la metodología tradicional de acuerdo a Ochman *et al.*, 1988.**

Primer Forward	Sequence 5' → 3'	Primer Reverse	Sequence 5' → 3'
iPCRODCf1	ATGGGAGTTGAAGCGGAGT	iPCRODCr1	AGAGACAGCAAGGCACTTCG
iPCRODCf2	GCCC GTTGGATCTGGAGT	iPCRODCr2	CTCGTGGCATTCTCAGTG
iPCRODCf3	GCCA ACTATTTGTGGTTCG	iPCRODCr3	CCACAAGTCAGCGACGTAGA
iPCRODCf4	TACTGAGAAAATGCCACGA	iPCRODCr4	GTTGGCAGCCATCCTGTTAT

GATGTTGGCAGGCTTTACGCCTTCATCAGGACTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCAGTG  
*iPCRODCr3*

CAGTGTGTCAACGTATAACAGG**ATG**GCTGCCAACTATTTGTGGGTT**CGA**AGTGCCTTGCTGTCTCTGC  
*iPCRODCr4* **iPCRODCf3** *iPCRODCr1*

AGGCTTT**CACTGAGAAAATGCCACGAG**TGAGGCCGTTTTACGCTGTAAAGTGCAACCCGGACCCTGT  
**iPCRODCf4** *iPCRODCr2*

AATGCTGCGCGTTTCTGGCCAATTTAGGCTGTGGGTTTCGACTGTGCATCAGCAAAGGAAATGGCAACAG

TTCTAGACATGGGAGTTGAAGCGGAGTCGATTGTGTTGCCCATCCATGCAAAC**GCCCGTTGGATCTG**  
**iPCRODCf1** **iPCRODCf2**

**GAGTTT**GCAATTGAGACTAATGTTACGGTACGCTTGTCTCGGTACAATCGCAGAAACATCCTGTGCCTTT  
GCACGT

**Fig 4: Localización en la secuencia de *GiODC* de los cebadores empleados en la metodología implementada de acuerdo a Ochman *et al.*, 1988. El codón de inicio ATG se marca en rojo.**

La combinación de estos cebadores previamente diseñados permitió establecer 7 juegos distintos para la primera ronda y 20 para la segunda (*nested*) ronda de amplificación, la cual servirá como confirmación del fragmento amplificado (Tabla 5).

**Tabla 5: Combinaciones de cebadores empleados en las rondas de amplificación de acuerdo al método tradicional de Ochman *et al.*, 1988.**

Primera ronda PCR	Segunda ronda PCR
iPCRODCf1- iPCRODCr1	iPCRODCf2- iPCRODCr3 iPCRODCf2- iPCRODCr4
iPCRODCf1- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr3 iPCRODCf2- iPCRODCr4
iPCRODCf1- iPCRODCr4	iPCRODCf2- iPCRODCr3
iPCRODCf3- iPCRODCr4	iPCRODCf1- iPCRODCr3 iPCRODCf2- iPCRODCr3 iPCRODCf4- iPCRODCr3
iPCRODCf4- iPCRODCr1	iPCRODCf1- iPCRODCr3 iPCRODCf1- iPCRODCr4 iPCRODCf2- iPCRODCr3 iPCRODCf2- iPCRODCr4
iPCRODCf4- iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr1 iPCRODCf1- iPCRODCr3 iPCRODCf1- iPCRODCr4 iPCRODCf2- iPCRODCr1 iPCRODCf2- iPCRODCr3 iPCRODCf2- iPCRODCr4
iPCRODCf4- iPCRODCr4	iPCRODCf1- iPCRODCr3 iPCRODCf2- iPCRODCr3

A continuación, el ADN genómico obtenido tal como se explica en el apartado de Material y Métodos general (apartado 3), fue posteriormente digerido mediante 7 enzimas diferentes: *Alu* I (-AGCT), *Bam*HI (-GGATCC), *Eco*RI (-GAATTC), *Eco*RV (-GATATC), *Hind*III (-AAGCTT), *Sac*I (-GAGCTC) y *Xho*I (-CTCGAG), las cuales no presentan ningún sitio de corte dentro de la zona de nuestro gen escogida para el diseño de cebadores. La elección de estas enzimas se realizó a partir de una digestión previa *in silico* del fragmento codificante del gen *GiODC* (Acc. number: FJ223132) con el software NEBcutter (V2.0, BioLabs, New England <http://tools.neb.com/NEBcutter2>), el cual permite seleccionar el tipo de enzima a usar, el número de cortes, así como diferentes parámetros (si la secuencia es lineal o circular o seleccionar únicamente una parte de la misma para el análisis). Las características de las enzimas empleadas se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6: Enzimas de restricción empleadas en la metodología tradicional de acuerdo a Ochman *et al.*, 1988.**

Casa comercial	Enzima	Secuencia de corte	Tª de digestión (°C)	Tª de inactivación (°C)	Concentración final según proveedor (U µL <sup>-1</sup> )
New England Biolabs	<i>Alu</i> I	AG <sup>^</sup> CT	37	65	10
New England Biolabs	<i>Bam</i> HI	G <sup>^</sup> GATCC	37	80	20
Takara Clontech	<i>Eco</i> RI	G <sup>^</sup> AATTC	37	65	8-20
Takara Clontech	<i>Eco</i> RV	GAT <sup>^</sup> ATC	37	80	8-20
Takara Clontech	<i>Hind</i> III	A <sup>^</sup> AGCTT	37	80	8-20
Takara Clontech	<i>Sac</i> I	GAGCT <sup>^</sup> C	37	65	4-12
New England Biolabs	<i>Xho</i> I	C <sup>^</sup> TCGAG	37	80	20

Las condiciones experimentales para el proceso de digestión fueron aquellas establecidas por el proveedor. Cada digestión se realizó de manera individual en microtubos de 1,5 mL estériles en bloque calefactor durante 3 horas a 37 °C; las digestiones se realizaron en un volumen final de 20 µL tal como se especifica a continuación:

- 2,5 µL de ADN genómico
- 1 µL de la enzima (\*)
- 2 µL de buffer 10X (específico de cada enzima)
- 14,5 µL de DDW

(\*) La concentración final de las enzimas en la reacción depende de la concentración inicial de cada una y viene especificada por el proveedor (Tabla 6).

Tras la digestión, las enzimas fueron inactivadas durante 20 min de acuerdo a la temperatura especificada en la tabla 6. Finalmente, se realizó una electroforesis de comprobación en gel de agarosa (1%), 75 V, para determinar que el ADN estaba completamente digerido. En caso contrario, la digestión se prolongó durante 1 o 2 horas más.

Los fragmentos digeridos fueron purificados mediante el sistema comercial de purificación *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison WI, USA). Este es un sistema de purificación en columnas para fragmentos de ADN de entre 55 pb hasta más de 10 kb. Se basa en la afinidad del ADN a las membranas de sílice contenidas en las columnas, las cuales retienen el ADN, y tras sucesivos lavados permiten obtener un ADN libre de impurezas.

Tras la digestión y purificación, se realiza el proceso de ligación, el cual consiste en la circularización de los fragmentos de ADN. Este proceso permite el establecimiento de un enlace fosfodiéster entre los extremos generados tras la digestión con las endonucleasas. Se empleó la enzima T4 ligasa (Promega, Madison WI, USA), dependiente de ATP, para la ligación de los distintos fragmentos. En detalle, el protocolo consistió en la incubación de los reactivos (tabla 7) en un horno de incubación a 20 °C durante aproximadamente 16-18 horas. Cada reacción se realizó en microtubos individuales.

**Tabla 7: Reactivos empleados en la ligación de los fragmentos de ADN.**

Componentes de la reacción	Volumen en la reacción	Concentración final en la reacción
ADN molde	X µL (variable)	100-150 ng
Buffer (10X)	30 µL	1X
ATP (100 mM)	3 µL	1 mM
Enzima T4 ligasa	1 µL	(1 U)
DDW	Hasta 300 µL	

Tras la incubación, los fragmentos ligados son sometidos a un incremento de temperatura a 70 °C durante 20 minutos para inactivar la enzima. Finalmente, se repite el paso de purificación con el sistema *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* previo al proceso de amplificación.

A continuación se realiza la amplificación del ADN. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™, (Biorad, Hercules, CA, USA) manteniendo las siguientes condiciones para ambas rondas: desnaturalización de la doble hebra de ADN

a 94 °C durante 1,5 min, hibridación durante 1 min y elongación durante 5 min a 72 °C. Estas tres etapas componen un ciclo, las cuales se repitieron 38 veces. Asimismo, se incluyó un aumento inicial de temperatura, 96 °C durante 5 min, para asegurar la desnaturalización de ambas cadenas de ADN y una etapa final de elongación de 10 min a 72 °C. La temperatura de hibridación se modificó en función de los distintos juegos de cebadores. El volumen final de las reacciones fue 50  $\mu$ L, tal como se establece en la tabla 8.

**Tabla 8: Reactivos empleados en las distintas reacciones de amplificación de los fragmentos de ADN.**

Componentes de la PCR	Volumen en la reacción ( $\mu$ L)	Concentración final en la reacción
Buffer 5X PrimeSTAR™ (TAKARA BIO INC)	10	1X
dNTPs mix (2,5 mM/c.u) (TAKARA BIO INC)	4	0,2 mM/c.u
Cebador Forward (10 $\mu$ M)	2	0,4 $\mu$ M
Cebador Reverse (10 $\mu$ M)	2	0,4 $\mu$ M
ADN (c.a. 100 ng)	5	
PrimeSTART™ HS ADN Polymerase (2,5 U/ $\mu$ L) (TAKARA BIO INC)	0,5	1,25 U
Completar con DDW hasta	50	

Todos los productos de amplificación fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (1%) a 75V. Aquellos casos en los que se obtuvo una banda única, esta fue extraída del gel de agarosa y purificada usando el sistema *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison WI, USA). La secuenciación fue llevada a cabo por la Unidad de Secuenciación de Sistemas Genómicos, Valencia, España.

Un esquema simplificado de las distintas etapas del proceso se muestra en la figura 5.

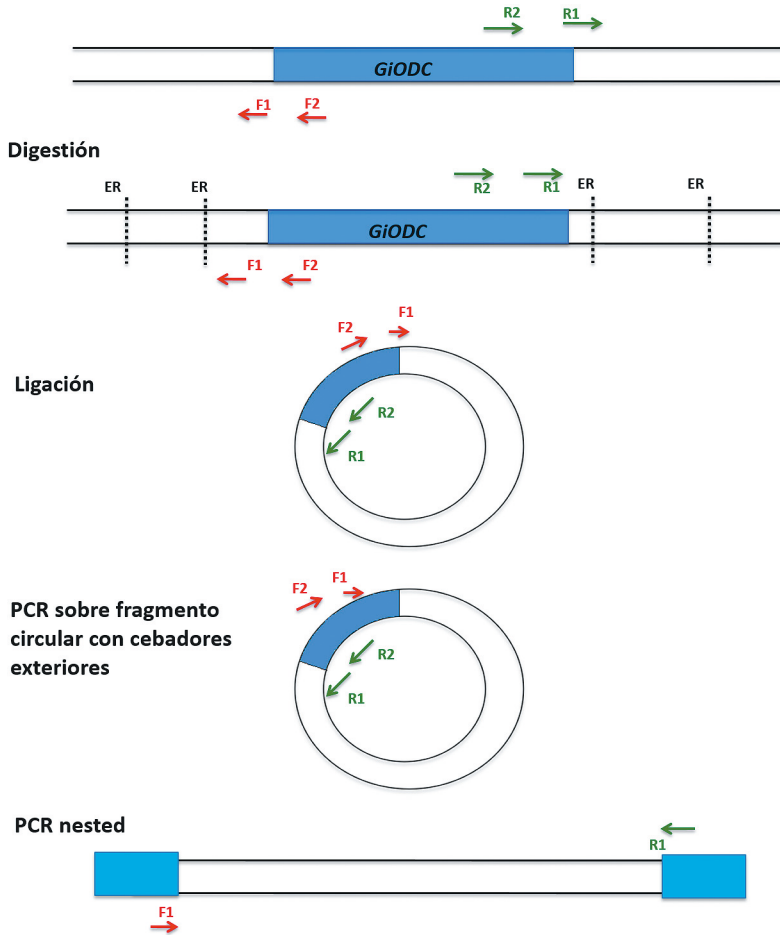
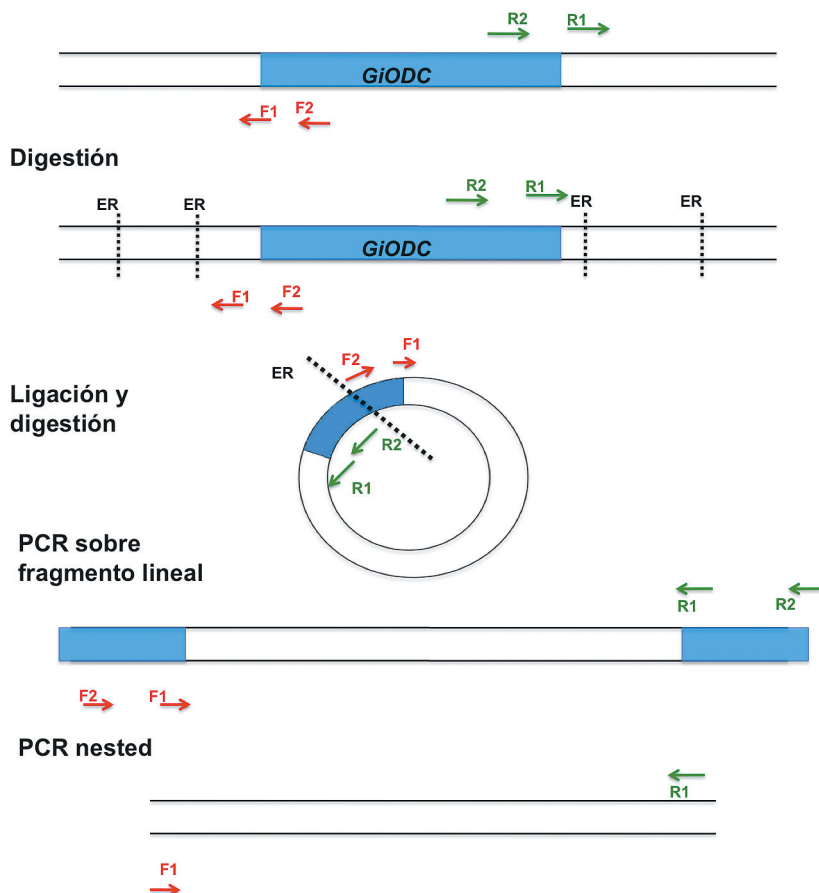


Figura 5: Esquema simplificado del proceso de amplificación de acuerdo al método tradicional de Ochman *et al.* 1988. *F1* y *F2* representan los cebadores con orientación *forward*, *R1* y *R2* representan los cebadores con orientación *reverse* y 'ER' representa los sitios de corte de las enzimas de restricción.

## Aproximación 2

La segunda aproximación consiste en la introducción de una segunda digestión tras la ligación y previa al proceso de amplificación (Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keeritake, 1989). De esta manera se consigue linearizar el ADN haciendo más accesible el acoplamiento de la polimerasa. Esta segunda digestión se realiza con endonucleasas cuyo sitio de restricción

se encuentra dentro de nuestra secuencia de estudio, pero que presenten un sitio único de corte para asegurar que la zona donde se han diseñado los cebadores quede en los extremos del fragmento a amplificar. En la figura 6 se muestra un esquema simplificado de las etapas de este procedimiento.



**Figura 6:** Esquema simplificado del proceso de amplificación modificado tras la inclusión de una segunda digestión de acuerdo a Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keeritake, 1989. F1 y F2 representan los cebadores con orientación *forward*, R1 y R2 representan los cebadores con orientación *reverse* y 'ER' representa los sitios de corte de las enzimas de restricción.

En este caso, el diseño de cebadores se realizó con el programa Primer 3 (<http://www.bioinfo.ut.ee/primer3/>) de acuerdo a lo descrito previamente. Se diseñaron 6 cebadores adicionales: tres con orientación *forward* (PF1, PF2 y PF3) y tres con orientación *reverse* (PR1, PR2 y PR3) (Tabla 9). La localización de los cebadores sobre la secuencia *GiODC* se muestran en la figura 7.

**Tabla 9: Cebadores diseñados con el programa Primer 3 para la metodología implementada de acuerdo a Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keeritake, 1989.**

Primer Forward	Sequence 5' → 3'	Primer Reverse	Sequence 5' → 3'
PF1	TCTACGTCGCTGACTTGTGG	PR1	ACTGTTGCCATTTCTTTGC
PF2	TTTAGGCTGTGGTTTCGACT	PR2	TACCGAGACAAGACGTACCG
PF3	GACTGTGCATCAGCAAAGGA	PR3	GCAAAGGCACAGGATGTTCT

**PF1**

GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTAAGTACTGTGTCTCT**ACGTCGCTGACTTGTGG**CAAGC  
 AGTGCAGTGTGTCAACGTATAACAGG**ATG**GCTGCCAACTATTTGTGGGTTCGAAGTGCCTTGC  
 TGTCTCTGCAGGCTTTCACTGAGAAAATGCCACGAGTGAGGCCGTTTTACGCTGTAAAGTGCAA  
**PF2** **PF3**  
 CCCGGACCCTGTAATGCTGCGGTTCTGGCCA**TTTAGGCTGTGGGTTTCGACTGTGCATCAGCA**  
*PR1*  
**AAGGAAATGGCAACAGT**TCTAGACATGGGAGTTGAAGCGGAGTCGATTGTGTTGCCCCATCCAT  
*PR2*  
 GCAAACGCCGTTGGATCTGGAGTTTGCAATTGAGACTAATGTT**ACGGTACGTCTTGCTCGGTA**  
*PR3*  
 CAATCGC**AGAACATCCTGTGCCTTTGCACGT**

**Figura 7: Localización en la secuencia del gen *GiODC* de los cebadores empleados en la metodología implementada de acuerdo a Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keeritake, 1989. El codón de inicio ATG se marca en rojo.**

La elección de las enzimas de restricción se realizó con el programa NEBcutter, de acuerdo también a lo descrito previamente. En este caso, se seleccionaron dos enzimas con un sitio único de corte dentro de nuestra región de estudio las cuales serán empleadas en la segunda digestión. Las características de las enzimas así como sus lugares de corte en la secuencia *GiODC* se muestran en la tabla 10 y figura 8 respectivamente.

En esta aproximación se realizó una primera digestión con las enzimas mostradas en la tabla 6 de acuerdo al protocolo previamente descrito. De igual manera y a continuación se ligaron los fragmentos con la enzima T4 ligasa (Promega, Madison WI, USA). Finalmente



se incluyó una segunda digestión con las enzimas mostradas en la tabla 10. Todas las reacciones de digestión se realizaron en microtubos individuales y la concentración final de las enzimas para cada digestión se especifica en las tablas 6 y 10. Asimismo, la combinación de todas las enzimas seleccionadas nos permitió disponer de 14 juegos para la digestión separada del ADN previo a la amplificación (Tabla 11).

Una vez obtenido el ADN doblemente digerido, este se sometió a sucesivas amplificaciones bajo las condiciones de reacción previamente descritas. En este caso, la selección de las parejas de cebadores se hizo en base a la enzima empleada en la segunda digestión, ya que es la que determinará la secuencia que quedará situada en los extremos de la región a amplificar. Las parejas empleadas se muestran en la tabla 12.

**Tabla 10: Enzimas de restricción empleadas en la segunda digestión de acuerdo al método establecido por Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keeritake, 1989.**

Casa comercial	Enzima	Secuencia de corte	Tª de digestión (°C)	Tª de inactivación (°C)	Concentración final según proveedor (U µL <sup>-1</sup> )
New England Biolabs	<i>BssSI</i>	CACGAG (-5/-1) <sup>^</sup>	37	65	20
New England Biolabs	<i>XbaI</i>	T <sup>^</sup> CTAGA	37	65	20

5'...

gatgttggcaggcttaccgccttcatcagggtactgtgtctctacgtcgctgac  
 ttgtggcaagcagtgacagtggtgtcaacgtataacagg**ATG**gctgccaac  
 tattgtgggttcgaagtgccttgctgtctctgcaggcttcactgagaaaatg  
 ccacgagtgaggccgttttacgctgtaaagtgaacccggaccctgtaatg  
 ctgcgcttctggccaatttaggctgtgggttcgactgtgcatcagcaaagg  
 aatggcaacagtt**ctaga**catgggagttgaagcggagtcgattgtgttcg  
 cccatccatgcaaacgcccggttgatctggagtttgcaattgagactaatgtt  
 acggtacgtctgtctcgggtacaatcgcagaacatcctgt...3'

**Figura 8: Secuencia de los primeros 500 nucleótidos del gen *ODC* de *Grateloupia imbricata* (Acc. number: FJ223132) y localización de los sitios de corte de las enzimas de restricción escogidas para la segunda digestión. En negrita se marca *BssSI*, en negrita y subrayado *XbaI* y en negrita y letra capital el codón de inicio (ATG).**

**Tabla 11: Diferentes combinaciones de enzimas para las dos rondas de digestión.**

Primera digestión	Segunda digestión
<i>Alu</i> I	i) <i>Bss</i> SI ii) <i>Xba</i> I
<i>Bam</i> HI	i) <i>Bss</i> SI ii) <i>Xba</i> I
<i>Eco</i> RI	i) <i>Bss</i> SI ii) <i>Xba</i> I
<i>Eco</i> RV	i) <i>Bss</i> SI ii) <i>Xba</i> I
<i>Hind</i> III	i) <i>Bss</i> SI ii) <i>Xba</i> I
<i>Sac</i> I	i) <i>Bss</i> SI ii) <i>Xba</i> I
<i>Xho</i> I	i) <i>Bss</i> SI ii) <i>Xba</i> I

**Tabla 12: Combinaciones de cebadores empleados en la segunda metodología de acuerdo a Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keeritake, 1989.**

Enzima	Primera ronda	Segunda ronda
<i>Bss</i> SI (-CACGAG)	PF2-iPCRODCr2	PF3- iPCRODCr1 PF3- iPCRODCr3 PF3- iPCRODCr4 iPCRODCf1- iPCRODCr1 iPCRODCf1- iPCRODCr3 iPCRODCf1- iPCRODCr4 iPCRODCf2- iPCRODCr1 iPCRODCf2- iPCRODCr4
	PF3- iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr1 iPCRODCf1- iPCRODCr3 iPCRODCf1- iPCRODCr4 iPCRODCf2- iPCRODCr1 iPCRODCf2- iPCRODCr4
<i>Xba</i> I (-TCTAGA)	iPCRODCf1- PR1	iPCRODCf2- iPCRODCr1 iPCRODCf2- iPCRODCr2 iPCRODCf2- iPCRODCr3 iPCRODCf2- iPCRODCr4

Todos los productos de amplificación fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (1%) a 75V. Aquellos casos en los que se obtuvo una banda única, esta fue extraída del gel de agarosa y purificada usando el sistema *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison WI, USA).

La secuenciación fue llevada a cabo por la Unidad de Secuenciación de Sistemas Genómicos, Valencia, España.

## 2. Análisis de las secuencias obtenidas e identificación de la zona 5' UTR del gen *GiODC*

Para el análisis de las secuencias obtenidas, se realizaron alineamientos locales entre los fragmentos secuenciados y la región codificante del gen (*GiODC*, Acc. number: FJ223132) empleando el programa de alineamiento de secuencias Water EMBOSS (Rice *et al.*, 2000) con los parámetros establecidos por defecto. El alineamiento se generó a partir del codón de inicio de la transcripción ATG hacia el extremo 5'. Las diferentes secuencias generadas hacia el extremo 5' derivadas de la unión del fragmento original con fragmentos de diferente longitud de la secuencia obtenida fueron comprobadas mediante el programa Blastn. La validación de las mismas se hizo en base a i) un valor del solapamiento superior al 50% y ii) la identificación de la secuencia resultante como *ODC* en *G. imbricata*.

Para la identificación y localización de motivos reguladores o factores de transcripción (FTs) contenidos en la región 5' del gen *GiODC*, se realizó un análisis de la misma con las bases de datos mostradas en la tabla 13.

**Tabla 13: Bases de datos empleadas para el análisis de la secuencia y la identificación de motivos reguladores en la misma.**

BASE DE DATOS	
MEME <a href="http://meme-suite.org/">http://meme-suite.org/</a>	Programa informático para la identificación de motivos en un grupo de secuencias de ADN o proteínas relacionadas. Permite identificar nuevos motivos, no acoplados (recurrentes, patrones de longitud fija) en la secuencia de estudio.
GOMO <a href="http://meme-suite.org/tools/gomo">http://meme-suite.org/tools/gomo</a>	Base de datos que utiliza los motivos de unión al ADN localizados en los promotores para determinar si alguno de los mismos está significativamente asociado con genes relacionados con uno o más términos de ontología del genoma (GO: Gene Ontology). Los términos GO significativos pueden sugerir los papeles biológicos de los motivos.
RBPDB <a href="http://rbpdb.cbr.utoronto.ca/">http://rbpdb.cbr.utoronto.ca/</a>	Base de datos especializada en proteínas de unión al ARN. No acepta formato FASTA ni nucleótidos degenerados.
NSITE-PL <a href="http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=nsitep&amp;group=programs&amp;subgroup=promoter">http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=nsitep&amp;group=programs&amp;subgroup=promoter</a>	Reconocimiento de motivos reguladores en plantas mediante análisis estadístico.
UTRscan <a href="http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan">http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan</a>	UTRscan busca patrones en la secuencias de proteínas o nucleótidos (ADN, ARN, ARNt) con el fin de encontrar motivos.

**Continuación tabla 13:**

UTRdb and UTRsite <a href="http://itbtools.ba.itb.cnr.it">http://itbtools.ba.itb.cnr.it</a>	Colección de secuencias y motivos reguladores de las regiones no traducidas de mARNs eucariotas. Asimismo permite descargar regiones 5' y 3' de diferentes especies validadas experimentalmente.
JASPAR CORE Plantae <a href="http://jaspar.genereg.net">http://jaspar.genereg.net</a>	La base de datos JASPAR CORE contiene un conjunto preciso y no redundante de sitios de unión para factores de transcripción en eucariotas obtenidos experimentalmente.
AmiGO <a href="http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi?action=advanced_query&amp;session_id">http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi?action=advanced_query&amp;session_id</a>	Permite asociar los motivos identificados con su posible función biológica asociada.
TAIR <a href="https://www.Arabidopsis.org">https://www.Arabidopsis.org</a>	Información completa del genoma de <i>Arabidopsis</i> .
PLACE <a href="https://sogo.ADN.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?sid=&amp;lang=en&amp;pj=640&amp;action=page&amp;page=newplace">https://sogo.ADN.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?sid=&amp;lang=en&amp;pj=640&amp;action=page&amp;page=newplace</a>	Base de datos de los motivos o elementos reguladores actuando en <i>-cis</i> encontrados en plantas.
ConSite <a href="http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite">http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite</a>	Una herramienta para explorar los sitios de unión de factores de transcripción en secuencias genómicas.

### 3. Estructura nucleotídica de la 5' UTR y relación filogenética

Con el objetivo de intentar establecer una posible similitud estructural entre la región 5' de diferentes genes *ODC* y la presencia de motivos conservados, se empleó la base de datos UTRdb para i) compilar las secuencias existentes correspondientes a la región 5' de dicho gen, ii) identificar motivos o elementos conservados comunes y iii) realizar la construcción de un árbol filogenético.

La base de datos UTRdb (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it>) contiene secuencias de las regiones UTR (3' y 5') para organismos de diferentes grupos. De las secuencias anotadas, se recopilaron un total de 68 correspondientes a 14 mamíferos (anotadas en la base de datos como 'Mam'); 4 a roedores ('Rod'); 15 a invertebrados ('Inv'); 7 a plantas ('Pln'); 23 a primates ('Pri') y 5 a vertebrados ('Vrt') (Tabla 14). Aquellas secuencias redundantes, es decir, múltiples anotaciones para el mismo organismo, y aquellas con una longitud inferior a 200 nucleótidos, consideradas poco restrictivas a la hora de realizar el alineamiento, fueron descartadas.

**Tabla 14: Especies identificadas en la base de datos UTRdb con secuencias anotadas para la región 5' UTR para el gen *ODC*. Las especies marcadas en negrita y subrayadas fueron empleadas en la realización del árbol filogenético.**

Grupo	Especie	Nombre común	Gen ID
Invertebrados	<i>Aedes aegypti</i>	Mosquito de la fiebre amarilla	5569724
	<i>Bombyx mori</i>	Gusano de seda	732996
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo	179079
	<i>Ciona intestinalis</i>	Urocordado	100184176
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca de la fruta	35766
	<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata	8039074
	<i>Naegleria gruberi</i>	Ameba	8862416
	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Gusano	100303479
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Erizo	589060
	<i>Tribolium castaneum</i>	Escarabajo	656985
	Mamíferos	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Oso panda gigante
<i>Bos taurus</i>		Vaca	281365
<i>Canis lupus familiaris</i>		Perro	475666
Plantas	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	Hongo (Ascomicota)	8506948
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Microalga verde	5723008
	<i>Coccidioides posadasii</i>	Hongo	9692924
	<i>Laccaria bicolor</i>	Hongo	6076363
	<i>Penicillium marneffeii</i>	Hongo (Ascomicota)	7026570
	<i>Populus trichocarpa</i>	Alamo	7453603
	<i>Phytophthora infestans</i>	Hongo (Oomicete)	9469903
	<i>Talaromyces marneffeii</i>	Hongo	7026570
<i>Vitis vinifera</i>	Vid	100233080	
Primates	<i>Callithrix jacchus</i>	Tití común	100404336
	<i>Homo sapiens</i>	Ser humano	4953
	<i>Macaca mulatta</i>	Macaco Rhesus	694559
	<i>Pan troglodytes</i>	Chimpancé común	459027
	<i>Pongo abelii</i>	Orangután de Sumatra	100435590
Roedores	<i>Mus musculus</i>	Ratón común	18263
	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata parda	24609
Vertebrados	<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	114426
	<i>Gallus gallus</i>	Gallo bankiva	421937
	<i>Xenopus laevis</i>	Rana africana	379859
	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	Rana	448028



Finalmente, un total de 12 secuencias, identificadas en negrita y subrayadas en la tabla 14 fueron seleccionadas para la realización del test filogenético y dos más empleadas como grupo externo y correspondientes al gen de la arginina descarboxilasa (*ADC*) de *Populus trichocarpa* (álamo) y *Vitis vinifera* (vid). Con todas ellas, se realizó un alineamiento con el programa Clustal Omega (McWilliam *et al.*, 2013) el cual es indicado para alineamientos múltiples con secuencias de longitud media-larga. Se seleccionaron los parámetros por defecto y se marcó la casilla *DNA* para indicar la naturaleza de las muestras. Realizado el alineamiento, este se descargó en un archivo de texto y se introdujo en el programa MEGA v.7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016) para análisis genético y evolutivo de secuencias de ADN y proteínas. Este archivo fue convertido a formato FASTA (Fig. 9) y fue empleado posteriormente en la realización de un árbol filogenético con los parámetros establecidos por defecto por el programa e indicados en la tabla 15.

**Tabla 15: Parámetros empleados para la generación de un árbol filogenético empleando el programa MEGA v. 7.0.21.**

<b>Tipo de secuencia</b>	<b>Nucleotídica</b>
Naturaleza de la secuencia	<i>Non- coding protein</i>
Tipo de análisis	Reconstrucción filogenética
Método estadístico	Máxima similitud
Test filogenético	Método Bootstrap
Número de iteraciones	1000
Método de sustitución	Nucleotídica
Modelo	<i>General Time Reversible</i>
Modelo de distribución	Gamma
Número de categorías	2
<i>Gaps</i>	Usar todos los sitios
Método de intercambio de ramas	<i>Nearest-neighbor-interchange</i>
Árbol inicial	Por defecto
<i>Swap branch filter</i>	Ninguno
Número de threads	1



Asimismo, cada una de las 12 secuencias fue analizada *in silico* a través de la base de datos Jaspar Core (<http://jaspar.genereg.net/>) para la detección de la presencia o no de motivos reguladores. Esta base de datos contiene anotadas las secuencias correspondientes a diferentes motivos y elementos reguladores para diferentes especies vegetales. Asimismo, permite introducir la secuencia estudio para el análisis e identificación de todos los motivos conservados y por otro lado, seleccionar únicamente aquellos motivos de interés y realizar una búsqueda en base a los mismos.

## 4. Análisis de la expresión diferencial de *GiODC*

### 4.1: Tratamiento de las muestras

A partir de los estudios previos *in vitro*, se han podido establecer dos puntos de referencia claros para evaluar la expresión génica de *GiODC* como gen candidato de la reproducción: i) el tiempo necesario de tratamiento inductor (*elicitation period*), y ii) el tiempo que tardan en aparecer las primeras estructuras reproductoras (*disclosure period*).

Para valorar la expresión génica mediante PCR a tiempo real (RT-qPCR), se probaron tres tratamientos inductores de la carpoesporogénesis de *G. imbricata* - fotoperiodo (FP), etileno (ET) y metil jasmonato (MeJa)- y que además estaban relacionados con la presencia de los factores de transcripción en la zona 5' UTR de *GiODC*.

En relación al FP, el tratamiento se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.1 del Material y Métodos general (Tabla 16).

El tratamiento con ET se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.2 del Material y Métodos general (Tabla 16).

Para el tratamiento con MeJa se procedió de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.3 del Material y Métodos general (Tabla 16).

Todo el material se aclimató previo a cada experimento durante 2 días en acuarios de 8 L de capacidad, y se mantuvo en cultivo con fotoperiodo 18 h L: 6 h O con una irradiancia de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

La expresión fue medida tras el tratamiento inductor ( $t=0$ ) y en el momento en que los cistocarpus fueron visibles ( $t=d$ ), de acuerdo a la tabla 16.



**Tabla 16: Tipos de inductores empleados para evaluar el nivel de expresión de *GiODC* durante el desarrollo del cistocarpo. STS: Silver thiosulphate (inhibidor). (\*\*) representa el tratamiento inductor. L : O (Luz: Oscuridad).**

Inductor	Tratamiento	Periodo inductor (t=0)	Aparición de cistocarpos (t=d)
Luz	12 h L: 12 h O (**)	1 semana	2 semanas
	6 h L: 18 h O		
	18 h L: 6 h O (control)		
Etileno	**	15 min	1 semana
	STS		
	control		
MeJa	**	1 h	48 h
	Fenidona		
	Control		

La valoración de la expresión se realizó por triplicado con dos réplicas independientes cada una para cada uno de los tratamientos. Para ello, de cada tratamiento, se obtuvo ARN mediante el protocolo establecido para el reactivo TRI (Sigma-Aldrich) tal como se ha descrito en el apartado 4 del Material y Métodos general. La calidad del ARN se determinó mediante gel de agarosa en base a la presencia de las dos bandas de ribosómico correspondientes y se cuantificó su concentración mediante espectrofotómetro según lo descrito en el apartado 4.1 de Material y Métodos general.

La síntesis de ADNc fue realizada mediante transcripción inversa de acuerdo a lo descrito en el Material y Métodos general apartado 5.

#### 4.2: Determinación de la expresión

La expresión de *GiODC* se normalizó de acuerdo a los genes constitutivos previamente validados por García-Jiménez y colaboradores, 2009 (Tabla 17). mediante el programa GeNorm. Para ello y en base a lo establecido por Vandesompele y colaboradores (2002, 2009), se determinó la media geométrica de nuestro gen de interés y se normalizó a la media de los genes constitutivos. El programa por tanto da un valor de corrección el cual debe aplicarse a los datos *brutos* de expresión. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (SE), tomando como valor 1 los controles correspondientes.

**Tabla 17: Secuencia y denominación de los cebadores de los genes constitutivos empleados en las reacciones de amplificación a tiempo real. GTLSR1: *Grateloupia Large Ribosomal Sub-unit1*; GTLS2: *Grateloupia Large Ribosomal Sub-unit2*; CCEF: *Chondrus crispus Elongation Factor*, HPEF: *Haematococcus Pluvialis Elongation Factor*.**

Cebadores			Secuencia (5'-3')
Constitutivos	GTLSR1	F R	GGCTTTTTAGTGGCTGATAATC CACTCCGTCGTCCTCACC
	GTLS2	F R	GACCCGAAAGATGGTGAAC TA CTACGAGCCTCCACCAGAGT
	CCEF	F R	CACGGACTCTTACCATTACACC CCAGTAATCATGTTCTTGATGA
	HPEF	F R	CACGTCGACTCCGGTAAATC GCTTGTCGATACCTCCAAC
GiODC	uplODC	F R	AATGTGGTGGGTGTGTCCTT TAGTGGGTAGGCATCACACG

#### 4.3: Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos por RT-qPCR se realizó empleando el programa Statgraphics Plus 3.1 para Windows (Statistical Graphics Co., Rockville, MA, EE.UU.). Para la determinación de las posibles diferencias existentes entre los diferentes grupos de muestras tratados y sus controles en los t=0 (periodo de inducción) y t=d (momento de aparición de cistocarpos), se llevó a cabo un análisis ANOVA para un factor ( $p \leq 0,05$ ).

## Resultados

### 1. Paseo cromosómico, iPCR y análisis de las secuencias obtenidas

#### Aproximación 1

Tras diferentes pruebas de acuerdo al modelo tradicional de Ochman y colaboradores (1988) únicamente se obtuvo una secuencia de 242 nt tras la digestión con la enzima *EcoRV* y la consiguiente amplificación con los cebadores iPCRODCf3 (5' GCCAACTATTTGTGGG-TTCG 3') e iPCRODCr4 (5' GTTGGCAGCCATCCTGTTAT 3') en primera ronda y iPCRODCf4 (5' TCACTGAGAAAATGCCACGA 3') e iPCRODCr3 (5'CCACAAGTCAGCGACGTAGA 3') en *nested* (Tabla 18).

**Tabla 18: Combinaciones de cebadores probadas y resultados obtenidos de acuerdo a la metodología de Ochman *et al.*, 1988.**

Enzima	1ª ronda	2ª ronda	Resultado	Banda
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr1	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr1	iPCRODCf2- iPCRODCr4	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr1	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr1	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr4	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr4	iPCRODCf1- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr4	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf1- iPCRODCr1	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf1- iPCRODCr1	iPCRODCf2- iPCRODCr4	-	
EcoRV	iPCRODCf1- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf1- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr4	-	
EcoRV	iPCRODCf1- iPCRODCr4	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf3- iPCRODCr4	iPCRODCf1- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf3- iPCRODCr4	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf3- iPCRODCr4	iPCRODCf4- iPCRODCr3	X	TGGAGGGACGCGGCCCTTGCCTGAAC TCGGCGAGGAGAGATAGCCACGGGT TCGCCGTAGACGATCAGATCGACGTGT TCGTGCGGATTCCCATGAAGCAACACA CTGTTGCGTTCGCCCGACCAGAGATCC ACGACCGCTGCGAACGAGCCATCGGC CGGCCAGAGCCATCTCGCCATGACG GTTGAGCAGGTCGTTGAATCGGTCGGA GTTCAGGTCTACGTCGCTGACTTGTGGA
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr1	iPCRODCf1- iPCRODCr3	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr1	iPCRODCf1- iPCRODCr4	-	
EcoRV	iPCRODCf4- iPCRODCr1	iPCRODCf2- iPCRODCr3	-	

## Aproximación 2

Tras la modificación del protocolo e introducción de una segunda digestión previa al proceso de amplificación, se obtuvieron varias secuencias en torno a los 100-200 nt (Tabla 19). A destacar, y tras la digestión del ADN con la enzima *XhoI* y posteriormente y con *XbaI* y la amplificación en primera ronda con iPCRODCf1 (5' ATGGGAGTTGAAGCGGAGT 3') y PR1 (5' ACTGTTGCCATTTCTTTGC 3') y en segunda con iPCRODCf2 (5' GCCCGTTGGATCTGGAGT 3') y iPCRODCr3 (5'CCACAAGTCAGCGACGTAGA 3'), se obtuvo una banda de 602 nt (Tabla 19).

**Tabla 19: Combinaciones de cebadores probadas y resultados obtenidos de acuerdo a la metodología de Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keeritake, 1989.**

Enzima 1ª ronda	Enzima 2ª ronda	1ª ronda	2ª ronda	Resultado	Banda
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	PF3- iPCRODCr1	-	
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	PF3- iPCRODCr3	x	CGNGTNGANCCACGGGCCACAGGTCAGCG ACGTTTCATCATCGGGGGCAGTCAACGACG TTCTCCGGTGAGCCTCCAGTCAAGTACGGC ACTCTATCCACGGGCAGTTAGCGGGTTATT
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	PF3- iPCRODCr4	-	
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr1	-	
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr3	-	CGAGTACGTNCNACGGGCCACAGGTCAGC GACGTTTCATCCATCGGGGGCAGTCAACGCGA CGTAGATCCAACGGGCCACAAGTCAACGCGA CGTAGATCCAACGGGCCACAAGTCAACGCGA CGTACATCCAACGGGCCACAGGTCAGCGAC GTACATCCAACAAGCCGGTGGTCCGTGGCG GACATTAGATAGCTGGCGGGATC
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr4	-	
<i>AluI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr1	x	CTCGAANTCTGNTGCTTGNCCGNCCTTGG AACCTATCTCACTGACGGGTGGNNCACCCNC TTCGGGACGCCGAGCGGGGGTGAGCAG CCGGATCTACGTCNCTGACTTGTGG
<i>AluI</i>	<i>BssSI</i>	PF2-iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr4	-	
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	iPCRODCf1- PR1	iPCRODCf2- iPCRODCr1	-	
<i>XhoI</i>	<i>BssSI</i>	PF3- iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr3	x	CGCACTACTNGTGATCCANAGGNNCNCNNN ATGCAGATCTGGCAGNNNNNACTGANGCC TGNTGGGAAAGCCAGCGGCACCTTCAGC GACGCCACGTACTCCAGATCCAACGGGCA
<i>XhoI</i>	<i>XbaI</i>	iPCRODCf1- PR1	iPCRODCf2- iPCRODCr2	-	

Continuación tabla 19:

<i>Xho</i> I	<i>Bss</i> SI	PF3- iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr3	x	CGCACTACTNGTGATCCANAGGNNCNNNN ATGCAGATCTGGCAGNNNNNACTGANGCC TGNCCTGGGAAAGCCAGCGGCACCCTTCAGC GACGCCACGTACTCCAGATCCAACGGGCA
<i>Xho</i> I	<i>Xba</i> I	iPCRODCf1- PR1	iPCRODCf2- iPCRODCr2	-	
<i>Xho</i> I	<i>Xba</i> I	iPCRODCf1- PR1	iPCRODCf2- iPCRODCr3	x	TGCGGTTTGGTCCGGGACTCTGGACTCA AGGACCCTTATGTTNNNTGGAAGGTGAG GTGGGCGCTGCTGGACACTTCATGTNCCC GTATTANCTTCACTTGCCACCAATAACGA TGGCGATACTCAGCTAATCTGGCCCCCTC GTTTCATGATNCATCTGGAGATCCACTGGG ANCCTTCATTTTTGGATCAACGTGATTCTCT GATTGTGCTACCTGCCTAAGTTACACGTAT ATTCNACTACCCGGATAATATCTCCTGGA GATNCTTCNCCTTTGTCTGTTGAGCTGACTG CGGCTCACAAGGCGGAATTCACATGTCTGG TCCAACACTTGGACTGTCGAGGTGCTTCTGA ACGAAGAACTCNCCTCCGANNNGTAATATT NTTCCCGCCTATTGTTCTAGCAATAGGTC NACTGATGATGAAAGATCAAGCGAAAAN TTCTATTGCTCATTGNAGGGCACCGTGACA AGTTTAAAGACTTGTGGGGCAGTCAGTAT CTCACCTGTTTCTCAGTCCGTACGGCTTT GCACACTCCTGCCTCTAACTTTGGTTCCA CATTGTACTTCCAATGTTGCTTAGCTTA
<i>Xho</i> I	<i>Xba</i> I	iPCRODCf1- PR1	iPCRODCf2- iPCRODCr4	-	
<i>Xho</i> I	<i>Xba</i> I	iPCRODCf1- PR1	iPCRODCf2- iPCRODCr1	-	
<i>Xho</i> I	<i>Bss</i> SI	PF3- iPCRODCr2	iPCRODCf1- iPCRODCr4	-	
<i>Xho</i> I	<i>Bss</i> SI	PF3- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr1	-	
<i>Xho</i> I	<i>Bss</i> SI	PF3- iPCRODCr2	iPCRODCf2- iPCRODCr4	-	

Tras los diferentes análisis descritos en Material y métodos y de acuerdo al criterio establecido (identificación como *ODC* y un porcentaje de similitud superior al 50% en el solapamiento con la región conocida de *GiODC*), la única secuencia que cumplía los mismos fue obtenida tras la amplificación con iPCRODCf1 y PR1 en primera ronda y en segunda ronda con iPCRODCf2 y iPCRODCr3. La secuencia resultante del solapamiento así como los diferentes valores obtenidos se muestran en la figura 10 y la Tabla 20, respectivamente.

NNNNNNNGANNNTNCNNNNCGGNNNATNGNNNTGCGGTTTGGTCCGGGCGACTCTGGA  
CTCAAGGACCCTTATGTTNNNTGGAAGGTGAGGTGGGCGCTGCTGGACACTTCATGTNC  
CCCGTATTANCTTCACTTGCCACCAATAACGATGGCGATACTCAGCTAATCTGGCCCCC  
TCGTTTCATGATNCATCTGGAGATCCACTGGGANCTTCATTTTTGGATCAACGTGATTCTC  
TGATTGTGCTACCTGCCTAAGTTACACGTATATTCNACTTACCCGGATAATATCTCCTGGAG  
ATNCTTCNCCTTTGTCTGTTGAGCTGACTGCGGCTCACAAGGCGGAATTCACATGTCTGGT  
CCAACACTTGAAGTTCGAGGTGCTTCTGAACGAAGAAGTCCNCCCCGANNNGTAATATTNTT  
CCCGGCCTATTGTTCTAGCAATAGGTCNACTGATGATGAAAGATCAAGCGAAAANTTCT  
ATTCGTCTATTGNAGGGCACCGTGACAAGTTTAAAGACTTGTGGCAAGCAGTGCAAGTGTG  
CAACGTATAACAGGATGGCTGCCAACTATTTGTGGGTTGCAAGTGCCTTGCTGTCTGCA  
GGCTTT

Figura 10: Secuencia correspondiente a la región 5' de *GiODC* obtenida por iPCR.

**Tabla 20: Diferentes alineamientos entre *GiODC* y la secuencia obtenida por iPCR.**

<b>GiODC (extremo 5')</b>	<b>Extremo 3' de la secuencia obtenida</b>	<b><a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html</a></b>	
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCA GTGC (70nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTTGCACTACTCCTGCCT CTAACTTTGGTTTCCACATTTGTAATCCAATGTT CGTCTAGCTTA (114nt)	Identity (%) 57,9	Score 95,5
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCA GTGC (70nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTTGCACTACTCCTGCCT CTAACTTTGGTTTCCACATTT (89nt)	57,9	95,5
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCA GTGC (70nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTT (53nt)	52,6	67,0
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTG (59nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTTGCACTACTCCTGCCT CTAACTTTGGTTTCCACATTTGTAATCCAATGTT CGTCTAGCTTA (114nt)	56,9	90,5
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCA GTGCAGTGTGTCAACGTATAACAGGAT (95nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTTGCACTACTCCTGCCT CTAACTTTGGTTTCCACATTTGTAATCCAATGTT CGTCTAGCTTA (114 nt)	52,6	113
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCA GTGCAGTGTGTCAACGTATAACAGGATGGCTG CCAATAATTT (109nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTTGCACTACTCCTGCCT CTAACTTTGGTTTCCACATTTGTAATCCAATGTT CGTCTAGCTTA (114 nt)	50,4	114
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCA GTGCAGTGTGTCAACGTATAACAGGATGGCTG CCAATAATTTGTGGGTTCAAGTGCCTTGCTGT CTCTGCAG (140nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTTGCACTACTCCTGCCT CTAACTTTGGTTTCCACATTTGTAATCCAATGTT CGTCTAGCTTA (114 nt)	44,7	122,5
GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTA CTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGCAAGCA GTGCAGTGTGTCAACGTATAACAGGATGGCTG CCAATAATTTGTGGGTTCAAGTGCCTTGCTGT CTCTGCAG (140nt)	GACTTGTGGGGCAGTCAGTATCTCACCTTGTTT CCTCAGTCCGTACGGCTTTGCACTACTCCTGCCT CTAACTTTGGTTTCCACATTTGTAATCCAATGTT CGTCTAGCTTA (114 nt)	36	128,5

## 2. Identificación y análisis de motivos conservados en la zona 5' del gen *GiODC*

El análisis de la secuencia obtenida con las bases de datos mostradas en la tabla 13, permitió la identificación de un total de 21 elementos conservados (Fig. 11).



**Figura 11:** Localización en la secuencia obtenida de los motivos identificados mediante su análisis *in silico* con diferentes bases de datos.

Estos motivos se clasificaron en distintas familias y subfamilias de FTs de acuerdo a la bibliografía consultada (Tabla 21) y, en su gran mayoría, se relacionan con distintos procesos fisiológicos en respuesta a estímulos variados.

**Tabla 21: Clasificación de los motivos y elementos identificados en las diferentes familias de proteínas.**

Familia	Subfamilia	Elemento /motivo	Secuencia consenso	Descripción	Anotación GO	Fuente	Referencias
bZIP	bZIP	AtBZIP52	LKLRL	Motivo de cremallera de leucina básica 52 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Factor de transcripción; unión al ADN; respuesta a estrés biótico y abiótico; homeostasis; procesos de elongación; defensa frente a patógenos; metabolismo; almacenamiento.	UniProt	Jakoby <i>et al.</i> , 2002; Guedes-Corrêa <i>et al.</i> , 2008; Kagale <i>et al.</i> , 2010.
		AtBZIP7	LRRL LRLVL	Motivo de cremallera de leucina básica 7 en <i>Brassica oleracea</i>			
MADS	MADS	Agamous	LKLNQL LELNL LELTL LPLTL LQLGL LKLGL DLNMEP LQLGL LSLFL LNLNLNL LNLNL	El motivo MADS es una región conservada de 56 aa que se encuentra dentro del dominio de unión a ADN de numerosos factores de transcripción eucarióticos y está codificada por una secuencia denominada caja MADS. Su nombre hace referencia a los cuatro miembros originalmente identificados: MCM1, AG, DEFA y SRF.	Factor de transcripción; unión específica de la ARN polimerasa II al ADN; actividad de homodimerización; respuesta celular a auxinas; desarrollo floral; regulador positivo y negativo de la transcripción, cascadas MAPK...	UniProt	Huang <i>et al.</i> , 1995; Shore y Sharrocks, 1995; Parenicová <i>et al.</i> , 2003; Sridhar <i>et al.</i> , 2006; Xie <i>et al.</i> , 2006; Adamczyk <i>et al.</i> , 2007; Gregis <i>et al.</i> , 2008, 2009; Gramzow y Theissen, 2010; Stiller y Perry, 2012; Saha <i>et al.</i> , 2015.
		AGL3	TTWCYAWWW WTRGWAA (seq pattern)	Existen dos tipos de genes MADS denominados tipo I y tipo II. En plantas estos grupos se distinguen por la disposición exón-intrón, la estructura del dominio, las tasas de evolución, la función de desarrollo y el grado de redundancia funcional.	Mantenimiento de la identidad floral meristemática; cascada MAPK, desarrollo del pétalo, sépalo y estambre; regulador positivo de la transcripción.		
		SQUAMOSA	NCGTACAA		Promueve el cambio de fase vegetativo y la floración. Regula patrones específicos de fase de diferenciación epidérmica foliar y tiempo de floración, pero no parece afectar la forma de la hoja.		
MYB	GAMYB Myb(related)	OsGAMYB	C/T A A C C/G G/A A/C C/A	Presencia de un dominio de unión a ADN altamente conservado en el extremo N en animales, levaduras y plantas, y típicamente consiste entre 1-4 repeticiones imperfectas (R0, R1, R2 y R3). Cada repetición contiene aproximadamente 50-53 aminoácidos y codifica tres hélices $\alpha$ , formando la segunda y tercera una estructura de hélice-vuelta-hélice (HTH). La familia MYB se puede dividir en cuatro clases, 1R-, R2R3- (siendo específicas para plantas), 3R- y 4R.	Activador transcripcional de la expresión de alfa-amilasa en las reservas de aleurona. Participa en el desarrollo de polen y órganos florales. Puede unirse a la caja 5'- TAACAAA -3' del promotor de alfa-amilasa en <i>Oryza sativa</i> . Funciones diversas: incluyendo metabolismo secundario; transducción de señales hormonales; respuesta a estrés ambiental; procesos de desarrollo y diferenciación celular; desarrollo floral.	UniProt	Abe <i>et al.</i> , 1997; Gubler <i>et al.</i> , 1999; Du <i>et al.</i> , 2012; Gómez-Gómez <i>et al.</i> , 2012; Ambawat <i>et al.</i> , 2013.
DOF	C2C2-Dof		DLNEPP	Proteína tipo dof con un dedo de zinc.	Unión al ADN; regulación transcripcional (activador o represor) en tejidos específicos o como respuesta ante estímulos como la luz.	UniProt	Yanagisawa y Sheen, 1998; Ljivetzky <i>et al.</i> , 2003; Yanagisawa 2004; Moreno-Risueno <i>et al.</i> , 2006; Nogueiro <i>et al.</i> , 2013.
	MNB1A=Dof1		AAAAGG en promotores de plantas	FT que se une específicamente a la secuencia de núcleo de consenso 5'AA (AG) G3' en el sitio de unión a MNF1.			



Continuación tabla 21:

bHLH		MYC2 MYC3 MYC4	CACGTG	MYC2, MYC3 y MYC4, tres factores básicos de transcripción de hélice-bucle-hélice que son conocidos por controlar de forma aditiva las respuestas de defensa relacionadas con jasmonatos.	FT de unión específica al ADN; regulación de la transcripción; rutas de señalización activadas por ácido abscísico; regulación de la respuesta de defensa y herida, desecación, ácido jasmónico, estrés oxidativo.	UniProt	Knight <i>et al.</i> , 2004; Zhao <i>et al.</i> , 2008; Mathieu <i>et al.</i> , 2009; Kagale <i>et al.</i> , 2010; Kang <i>et al.</i> , 2010; Woo <i>et al.</i> , 2010; Fernández-Calvo <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2011; Mizoi <i>et al.</i> , 2011; Niu <i>et al.</i> , 2011; Sharoni <i>et al.</i> , 2011; Zhuang <i>et al.</i> , 2013; Schweizer <i>et al.</i> , 2013; Moreno <i>et al.</i> , 2013; Rao <i>et al.</i> , 2015.
		PIF3	caja G (5'-CACGTG-3')	Factor de transcripción que actúa positivamente en la vía de señalización del fitocromo mediante la interacción con el fitocromo A y B formando un complejo ternario con la caja-G.	FT de unión específica al ADN; regulación de la transcripción; señalización en la ruta de las giberelinas; respuesta a luz roja.		
		PIF5, PIL6		FT que actúan negativamente en la ruta de señalización del fitocromo B para promover la respuesta de evitación de la sombra.	FT de unión específica al ADN; regulación de la transcripción; proceso de síntesis del etileno; regulación en la ruta de síntesis de las auxinas; respuesta a luz azul.		
		PIL5, PIF1	CACGTG	También denominado PHY-INTERACTING FACTOR 1; phytochrome interacting factor 3-like 5; PIF1; PIL5; T2G17.2; T2G17_2	FT de unión específica al ADN; regulación de la transcripción; regulación positiva o negativa de morfogénesis y germinación de semillas; implicación en la ruta de las giberelinas y la clorofila.		
AP2/ERF	RAV	RAV1	5'CAACA-(N)n -CACCTG3' elemento en -cis	Se liga específicamente a las secuencias de reconocimiento bipartitas compuestas por dos motivos no relacionados, 5'-CAACA-3' y 5'-CACCTG-3'. Puede funcionar como regulador negativo del crecimiento y desarrollo de las plantas.	FT de unión específica al ADN; regulación de la transcripción; regulación en las vías reguladas por etileno; desarrollo de hoja y raíces laterales; regulador negativo del desarrollo floral; respuesta a brasinosteroides.	UniProt	Sakuma <i>et al.</i> , 2002; Arroyo <i>et al.</i> , 2003; Saleh y Pagés, 2003; Nakano <i>et al.</i> , 2006; Licausi <i>et al.</i> , 2013.
	DREB/ERF	ABI4		FT activador	FT de unión específica al ADN; regulación de la transcripción; regulación en las vías reguladas por etileno y ácido abscísico; desarrollo de raíces laterales y crecimiento meristemático; regulador del movimiento estomatal, catabolismo de los triglicéridos y la localización proteica; respuesta estrés osmótico, azúcares y escasez de agua.		
		AP2	SMZ	Activador transcripcional en <i>Arabidopsis thaliana</i>	FT de unión específica al ADN; regulación de la transcripción; regulación en las vías reguladas por etileno; organización del cloroplasto.		

**Continuación tabla 21:**

HDZip		ATHB1 ATHB5	Secuencia consenso RRRKRTA- YTRYQLLE- LEKEFLF- NRYLTRRRRIEL AHSL- NLTERHIKWFAQ N-RRMK- WKKEN	Codifican un dominio típico de ADN 60 aminoácidos, conocido como homeodominio (HD) que caracteriza una gran familia de factores de transcripción. El dominio HD se pliega en una estructura 3D característica con tres hélices $\alpha$ , de los cuales la segunda y tercera forman un motivo de hélice-vuelta-hélice. Se han establecido grupos diferentes (dependiendo de los autores) para las proteínas HD vegetales basadas en la similitud de secuencias de sus HD y / o en la presencia de codominios característicos.	Controlan la expresión de un número limitado de genes mediante la unión al ADN y contribuyen a una regulación ajustada de la transcripción en respuesta a cambios ambientales rápidos.	UniProt	Kolodrubetz 1990; Weir <i>et al.</i> , 1993; Stemmer <i>et al.</i> , 1997; Bianchi y Agresti, 2005; Launholt <i>et al.</i> , 2006; Kwak <i>et al.</i> , 2007.
-------	--	----------------	--	---	--	---------	---

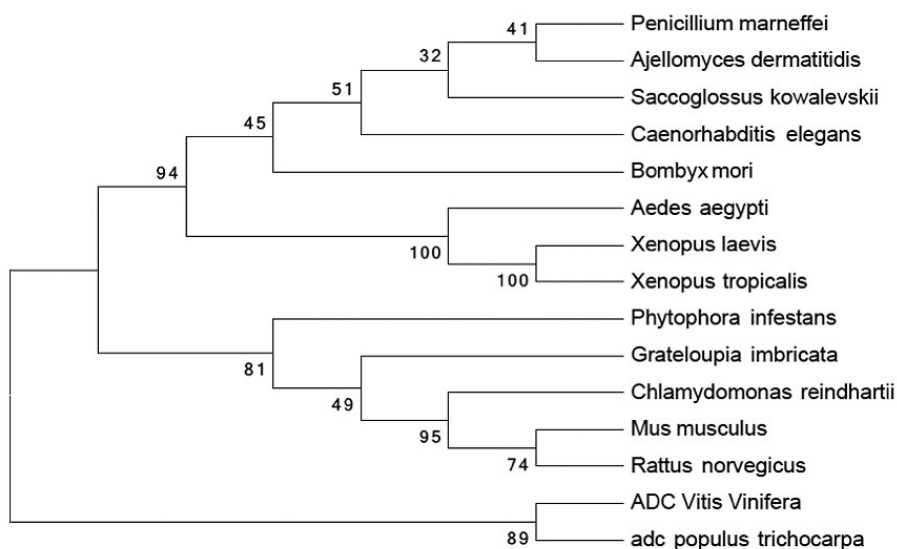
### 3. Estructura nucleotídica de la 5' UTR de diferentes genes *ODC*

El estudio de la estructura de la secuencia 5' así como su comparación con otras regiones 5' obtenidas de la base de datos UTRdb revela la presencia de motivos conservados en las mismas (tabla 22). En este caso, los motivos seleccionados están directamente implicados en la respuesta a los tratamientos inductores empleados, así *Abi 4*, *SMZ* y *RAV* responden a etileno; los factores *PIFs* a luz y los factores *MYCs* a la exposición a metil jasmonato.

La organización de los clades, conformados por las diferentes secuencias 5' UTR, muestra la región 5' de *G. imbricata* más próxima a *P. infestans*, un hongo de la clase Oomicetes, y a *C. reinhardtii*, una microalga verde. Asimismo, el enrutamiento con *P. infestans* presenta un valor del 81% lo que nos está indicando una alta probabilidad de que efectivamente estas secuencias presenten similitudes estructurales (Fig. 12).

**Tabla 22: Motivos reguladores identificados en las regiones 5' UTR-ODC recopiladas de la base de datos UTRdb y analizadas con Jaspas Core Plantae. 'x/-' denota 'presencia/ausencia' del elemento regulador respectivamente.**

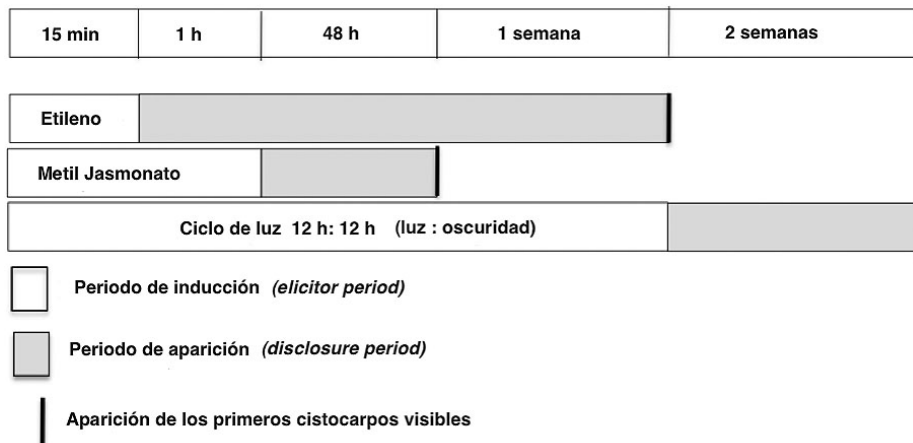
Grupo	Especie	Abi4	Dof	RAV	SMZ	PIFs	MYCs
Macroalga roja	<i>Grateloupia imbricata</i>	x	x	x	x	x	x
Microalga verde	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	x	x	-	-	-	-
Rana	<i>Xenopus laevis</i>	-	-	x	-	-	-
Rana	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	-	-	x	x	-	-
Ratón	<i>Mus musculus</i>	x	-	-	-	-	-
Ratón	<i>Rattus norvegicus</i>	x	-	-	-	-	-
Hongo	<i>Phytophthora infestans</i>	x	-	x	-	x	x
Hongo	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	-	-	x	x	-	-
Hongo	<i>Penicillium marneffeii</i>	x	-	x	-	-	-
Gusano de seda	<i>Bombyx mori</i>	x	-	x	-	x	x
Mosquito	<i>Aedes aegypti</i>	-	-	x	-	x	x
Gusano	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	-	-	-	-	-	x
Nemátodo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	-	-	x	-	-	-



**Figura 12: Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA v.7.0.211 y realizado con las secuencias recopiladas de la base de datos UTRdb.**

#### 4. Análisis de la expresión diferencial de *GiODC* bajo diferentes tratamientos inductores de la reproducción

Los datos de expresión muestran expresión diferencial del gen *GiODC* en función del tratamiento inductor y el grado de maduración de las estructuras reproductoras tal como se muestran en la tabla 23. La figura 13 es una representación esquemática de los tiempos empleados con los diferentes inductores y el periodo de visualización de las estructuras reproductoras.



**Fig 13: Representación esquemática de los diferentes tratamientos inductores en *G. imbricata*. La barra superior representa el tiempo de duración para cada tratamiento. Las barras en blanco se corresponden con el tiempo de inducción durante el cual los cistocarpos no están presentes. Las barras en gris representan el tiempo entre la aplicación del tratamiento y la aparición de los cistocarpos. Por otro lado, las barras verticales negras representan el momento de *disclosure* o momento en que los primeros cistocarpos se hicieron visibles.**

Tanto el FP como el ET afectan *GiODC* de manera similar provocando un aumento en la expresión previo a la aparición de los cistocarpos y tras el periodo de inducción. En relación al FP, se observan diferencias significativas 12 veces superiores con respecto al control (18 h L: 6 h O, valor 1 de expresión) para las muestras bajo FP 12 h L: 12 h O y día corto tras el tratamiento de inducción. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los valores de expresión en el momento de aparición de los cistocarpos para ninguno de los FP (Tabla 23).

Con respecto al ET, a t=0, se registró un aumento de 450 órdenes en la expresión de aquellas muestras tratadas en comparación con el control (nivel de expresión 1). Por otro lado,

la aparición de cistocarpos se corresponde con un incremento de 1,1 de expresión con respecto al control, lo que no es estadísticamente significativo. Aquellas muestras tratadas previamente con STS mostraron una expresión similar a los controles, tanto a  $t=0$  como  $t=d$  ( $1,9 \pm 0,10$  y  $1,0 \pm 0,10$ ) respectivamente, lo que no representa diferencias significativas (Tabla 23).

Los resultados de expresión de las muestras tratadas con metil jasmonato muestran, por el contrario, un patrón diferente. Se observa un máximo de expresión (incremento de 37 veces) tras la aparición de los cistocarpos ( $t=d$ ), mientras que, tras el periodo de inducción la expresión es sólo 1,3 veces superior al control (sin MeJa ni inhibidor, nivel 1 de expresión). Las muestras previamente tratadas con fenidona muestran menor expresión que los controles tanto a  $t=0$  como  $t=d$  ( $0,85 \pm 0,11$  y  $9,1 \pm 0,13$ ) respectivamente (Tabla 23).

**Tabla 23: Expresión normalizada de *GiODC* tras el periodo de inducción y en el momento de aparición de los primeros cistocarpos para los diferentes tratamientos inductores. Los valores muestran la media  $\pm$  desviación estándar para cada tratamiento al final del periodo de inducción y en el momento de la aparición de los cistocarpos. Cada media resulta de tres replicados obtenidos de manera independiente. (\*) indica las diferencias significativas entre las muestras tratadas y sus controles ( $p \leq 0,05$ ).**

Inductor	Muestras	Periodo inductor ( $t=0$ )	Aparición de cistocarpos ( $t=d$ )
Luz	12 h L: 12 h O	$11,7 \pm 0,84$ (*)	$0,84 \pm 0,10$
	18 h L: 6 h O (control)	1,00	$1,10 \pm 0,13$
	6 h L: 18 h O	$1,12 \pm 0,13$	$1,11 \pm 0,12$
Etileno	15 min	$450 \pm 1,3$ (*)	$1,1 \pm 0,14$
	Control	1,00	$0,99 \pm 0,10$
	STS	$1,9 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,10$
MeJa	1 h	$1,35 \pm 0,2$	$37,3 \pm 0,11$ (*)
	Control	1,00	$1,09 \pm 0,10$
	Fenidona	$0,85 \pm 0,11$	$9,1 \pm 0,13$

## Discusión

A pesar de la importancia que las macroalgas representan en sectores varios de la sociedad actual: industria alimentaria, farmacéutica o cosmética entre otras, el conocimiento existente sobre su fisiología y mecanismos moleculares subyacentes es escaso en comparación con el de las plantas superiores. No obstante, la presión de la sociedad, cada vez más preocupada por la importancia de una vida y unos hábitos saludables, así como el mayor conocimiento disponible sobre la toxicidad de algunos productos presentes en el mercado, ha servido como aliciente para ahondar en los diferentes aspectos de estos organismos, los cuales en comparación con las plantas terrestres, presentan un alto potencial biotecnológico.

Numerosos intentos por mejorar el conocimiento han sido llevado a cabo en los últimos años, poniendo de manifiesto la alta complejidad estructural, fisiológica y molecular de estos vegetales y destacando la importancia de un tejido competente (Baweja *et al.*, 2009; García-Jiménez y Robaina, 2015).

De manera específica, el proceso reproductivo supone un verdadero reto para los investigadores ya que tanto la complejidad del mismo, acentuada por la alta variedad de fases presentes en los diferentes grupos taxonómicos, como por la falta de consenso en genes marcadores, dificultan enormemente la estandarización de resultados.

El trabajo aquí presentado aporta información sobre los factores de transcripción o motivos que influyen el proceso reproductivo en algas rojas. El estudio planteado ha sido abordado desde un punto de vista molecular, apoyándose en las experiencias y trabajos fisiológicos previos, con el objetivo principal de encontrar respuesta, o al menos intentar dar una posible explicación a los cambios previamente observados *in vitro*. Asumiendo que cualquier modificación externa del individuo debe ser resultado de sucesos a nivel interno, el conocer los mecanismos y vías que rigen los mismos ayudará a entender mejor los diferentes aspectos involucrados.

Ciertamente, los estudios *in vitro* han ofrecido un sólido punto de partida debido principalmente a la robustez de los resultados. La reproducibilidad mostrada por la enzima ODC en los estudios de actividad enzimática y posteriormente a nivel génico (*GiODC*) han hecho de este gen un candidato potencial como señalizador de la transición a la etapa reproductiva en la macroalga roja *G. imbricata*. Asimismo, la identificación de las diferentes fases durante el ciclo de vida de esta alga indudablemente contribuyó al establecimiento de puntos de referencia para el cuidadoso control de la inducción de las estructuras reproductoras, fácilmente

distinguibles y reproducibles. En adición, el empleo de diferentes tratamientos inductores ha mostrado la capacidad de afectación de diferentes aspectos fisiológicos, pudiéndose controlar, entre otros aspectos, los periodos de maduración de las estructuras reproductoras *in vitro* lo que abre la puerta a estudios futuros de modificación y regulación del ciclo celular.

Ahora bien, sobre lo establecido también es necesario un mayor conocimiento sobre los diferentes aspectos que regulan la expresión de *GiODC*. Para ello, un primer paso es la obtención y conocimiento de la estructura 5' UTR del gen, la cual influye en el proceso de transcripción del mismo.

## 1. Paseo cromosómico e iPCR

El gen *ODC* (FJ 223132) en *G. imbricata* se compone de un fragmento de 1.861 pb correspondientes a la región codificante con la presencia de un intrón de 110 pb (García-Jiménez *et al.*, 2009). En referencia a esta especie, no existen secuencias depositadas actualmente en la base de datos del NCBI, con la excepción de parte de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCo) (García-Jiménez *et al.*, 2009) y parte de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa en *Grateloupia* sp. (Yang y Kim, 2015). La enorme carencia de información sobre su genoma ha supuesto un gran hándicap en el trabajo aquí desarrollado. Por ejemplo, el desconocimiento de ciertas características fundamentales como el porcentaje de G-C, dificultó la optimización del protocolo para la técnica de amplificación inversa a través del empleo de aditivos tales como el DMSO; que han sido probados efectivos en diferentes genomas ricos en G-C al ayudar a la separación de los puentes de hidrógeno formados entre estas bases (Hubé *et al.*, 2005; Musso *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2010).

La metodología tradicional (Ochman *et al.*, 1988) pese a haberse probado efectiva previamente en nuestro organismo de estudio (García-Jiménez *et al.*, 2009), no ofreció resultados satisfactorios en este caso. La probatura con los juegos de cebadores diseñados inicialmente únicamente resultó en la obtención de una secuencia de 242 nt tras la digestión con la enzima *EcoRV* y la consiguiente amplificación con los cebadores iPCRODCf3 e iPCRODCr4 en primera ronda y iPCRODCf4 e iPCRODCr3 en *nested*. Sin embargo, el estudio de esta secuencia y los posteriores alineamientos, no mostraron ni solapamientos significativos con *GiODC* ni similitud con secuencias depositadas en bases de datos conocidas; por lo que fue descartada. La falta de resultados positivos en este caso podría deberse a la dificultad de la polimerasa a anclarse al molde de ADN. Al encontrarse el ADN circularizado, cabe la posibilidad de que

la polimerasa se viese impedida por la presencia de alguna estructura secundaria tipo *hair-pin* presente en la región 5' (Loewen y Switala, 1995) ya que, es necesario considerar que al fin y al cabo, la transcripción es un proceso complejo cuya correcta iniciación y desarrollo requiere la interacción física de múltiples componentes. De nuevo, la falta de información sobre la estructura del genoma de *Grateloupia* sp. imposibilita una aseveración precisa al respecto. Asimismo, es necesario considerar el estado del ADN usado como molde para las repetidas amplificaciones. Aunque es cierto que todas las muestras de ADN genómico fueron estrictamente seleccionadas en base a unos estándares de calidad rigurosos, los subsiguientes procesos de digestión y ligación podrían indudablemente modificar dicha estructura inicial. Pese a haber sometido todos los productos a purificaciones, es imposible asegurar que el ADN final no contenga alguna característica o lesión que hubiese podido afectar la formación de la horquilla de replicación afectando la correcta mecánica de la polimerasa.

Sea como fuere, la introducción de una segunda digestión (Triglia *et al.*, 1988; Silver y Keertake, 1989) permitió la obtención de un mayor número de secuencias (Tabla 19). De entre ellas, una secuencia mostrando una longitud de 602 nt fue verificada como perteneciente a la 5' de *GiODC* (Tabla 20).

Tal como se observa, los alineamientos realizados en general muestran un porcentaje superior al 50% de identidad entre ambas secuencias. La identidad es un parámetro que nos indica el porcentaje de coincidencias exactas entre las secuencias alineadas incluyendo los espacios o *gap* encontrados. En este sentido, no existe un consenso sobre un valor umbral definido o estándar que de por 'bueno' un alineamiento (Troy *et al.*, 2001). La decisión por tanto de considerar un resultado como válido se ha basado en que el solapamiento entre las secuencias fuese conservado, y el análisis posterior del ensamblaje de ambas fuese reconocido como *GiODC* mediante el programa Blastn. En esta línea se observa además que según se consideren nucleótidos a partir del codón ATG hacia el extremo 3' de *GiODC*, el porcentaje de identidad va disminuyendo. Esto parece lógico ya que las regiones UTR no contienen información para la codificación de proteínas y por tanto, según avanzamos en la región codificante del gen, el solapamiento queda mantenido en el extremo 5' y por tanto la paridad disminuye.

Asimismo, se ha observado que variaciones en el número de nucleótidos alineados hacia el extremo 5' a partir del codón ATG de *GiODC* apenas afectan el porcentaje de identidad entre ambas secuencias, indicando que dicho alineamiento es estable y conservado. Esto refuerza la hipótesis de que la secuencia obtenida forma parte de la región promotora de *GiODC*.



Más aún, el valor o *score* dado por el programa es en todos los casos superior al 90%, con la excepción del caso en que únicamente se toma un número de nucleótidos inferior a 100-120 (Tabla 20). Finalmente, el resultado obtenido al introducir el ensamblaje de ambas secuencias (incluyendo únicamente 44 nt hasta el ATG) en el programa Blastn fue la identificación de la misma como '*Grateloupia imbricata* ornithine decarboxylase (*ODC*) gene, complete cds; FJ223132.1' con un *e*value de  $1e-11$ , lo que parece apoyar el resultado. Por tanto, se puede concluir que el solapamiento entre ambas secuencias supuso un crecimiento *upstream* de 529 nt hacia el extremo 5' a partir del codon ATG que codifica para el primer residuo de *GiODC* (Fig. 10).

## 2. Identificación y análisis de motivos conservados en la zona 5' del gen *GiODC*

El estudio de la composición y estructura de la región situada hacia el extremo 5' del gen *GiODC* ha representado un primer paso para continuar con los estudios de genómica funcional en las algas y ahondar en los diferentes aspectos del control transcripcional de los genes. En este sentido, es importante para nuestros objetivos conocer qué FTs o motivos reguladores se localizan dentro de la región 5' identificada que pudiesen afectar y/o ser potencialmente afectados por diversos estímulos los cuales, a su vez, modifiquen el nivel de expresión de *ODC* y consecuentemente el proceso de reproducción de *G. imbricata*.

El estudio de los FTs es ya de por sí altamente complejo y supeditado a numerosos condicionantes tales como la propia naturaleza del organismo, el estado fisiológico o el entorno. Si además se pretende estudiar cómo un determinado FT actúa sobre un proceso 'X', habría que añadir además variables como su disposición y localización en referencia al gen que regula o la interacción de ese FT con los diferentes FTs que lo rodean. Todo ello resulta en una combinación múltiple de factores interaccionando entre sí de diferente manera (independiente, antagónica o en sinergia) cuyo resultado está sometido además a unas condiciones determinadas. Por ello, es necesario focalizar qué elementos pueden ser un punto interesante de estudio para nuestros objetivos. En este caso, conocer cuáles podrían afectar la carpospogénesis en algas rojas y serían susceptibles de ser controlados.

Los resultados obtenidos, aunque representan una primera aproximación, nos han permitido identificar una lista de motivos conservados, poniendo de manifiesto una serie de evidencias que desarrollaremos a continuación.

En primer lugar, la escasez de base de datos específicas para macroalgas dificulta la obtención y validación de dichos resultados. El análisis se vió restringido a un grupo variado de organismos, *a priori* alejados de nuestro organismo de estudio, dentro de los cuales sólo encontramos la presencia de una microalga.

En segundo lugar y cómo se discutirá en la construcción del árbol, es probable que el papel del gen *ODC* presente variaciones en los diferentes organismos, quizás no tanto a un nivel funcional, sino mas bien en las especificidades de regulación a nivel transcripcional y/o post-transcripcional, las cuales podrían derivarse de la composición de su región 5', por lo que la comparativa entre los diferentes grupos aporta luz en este sentido.

Los FTs identificados a través de las diferentes bases de datos se caracterizan por ser secuencias cortas relacionadas con la regulación de diferentes procesos fisiológicos y metabólicos, y en muchos casos, presentan un papel regulador en diversos procesos. Una breve descripción de estos factores, así como de los procesos en los que actúan y la bibliografía para una consulta más detallada se muestran en la tabla 21.

En base a los antecedente previos resultado de los distintos estudios a nivel fisiológico (Rodrigo, 1998; García-Jiménez y Robaina, 2012; García-Jiménez *et al.*, 2016; Montero-Fernández *et al.*, 2016), se seleccionan de todos los FTs identificados, aquellos que presentan respuesta a variaciones en los regímenes de luz a nivel de fotoperiodo (PIF3, PIF4, PIF5 y Dof) o exposición a los inductores metil jasmonato (MYC2, MYC3 y MYC4) y etileno (SMZ, RAV y Abi4), y que se proponen como candidatos potenciales a afectar el proceso reproductivo en *G. imbricata*.

La respuesta a la luz es una de las más estudiadas en plantas superiores. Los factores de interacción del citocromo o PIFs son proteínas tipo bHLH necesarias en las respuestas mediadas por dicho estímulo a través de los fotorreceptores del fitocromo (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Los fitocromos son proteínas fotorreceptoras presentes en vegetales capaces de detectar la luz a través del grupo cromóforo que poseen, y desencadenar distintas respuestas tales como la floración o la germinación en respuesta a estímulos variados, p.e: el tipo o el régimen de luz recibido.

Los elementos PIF presentan una región bHLH muy conservada compuesta por una región básica de aproximadamente 25 aminoácidos por la cual interacciona directamente con el ADN y una región HLH de unos 60 aminoácidos implicada en la interacción con diferentes proteínas.

El primer factor de esta naturaleza identificado fue PIF3 a partir de un doble híbrido de levadura, empleando la región C-terminal del fitocromo B (PhyB) (Ni *et al.*, 1998). Existen otros miembros de esta familia, PIF1/PIL5, PIF4, PIF5, PIF6 y PIF7, los cuales comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos con PIF3 pero presentan diferencias tanto a la hora de actuar como en las interacciones mostradas con los diferentes fitocromos (Huq y Quail, 2002; Huq *et al.*, 2004; Leivar *et al.*, 2008).

Todos estos elementos son capaces de regular genes implicados en diferentes vías metabólicas, p.e: ruta de las auxinas, giberelinas o ET, o genes responsables de múltiples procesos fisiológicos como la senescencia, deetiología o fotomorfogénesis; tanto de manera directa o indirecta, como en acción coordinada con otros FTs.

En relación al el proceso reproductivo, estudios en *Arabidopsis sp.* con diversos mutantes PIF3 han revelado la presencia de hipocotilos más cortos y cotiledones más abiertos que en la planta silvestre sugiriendo una regulación negativa del proceso de fotomorfogénesis. Esto parece señalar que, en presencia de luz, los PIF se comportan como reguladores negativos del desarrollo, favoreciendo la transición a la etapa reproductiva y consecuentemente, la floración. Esto se ha observado también en situaciones de sombra, en las cuales se acelera la formación de flores y se reduce la formación de ramas (Casal, 2012).

En algas por otro lado y hasta la fecha, los estudios realizados en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Acetabularia sp.* no han mostrado FTs PIFs funcionales (Riaño-Pachón *et al.*, 2008; De Lucas y Prat, 2014). Sin embargo, es evidente que las algas responden a este tipo de estímulo, por lo que es posible que dicha regulación tenga lugar a través de una vía alternativa.

También relacionados con la respuesta a luz encontramos otra familia de FTs los cuales parecen ser específicos de plantas ya que hasta la fecha, no se han identificado FT con homología aparente en animales (Yanagisawa, 2004): Dof (*DNA-binding with One Finger*) (Yanagisawa y Sheen, 1998; Lijavetzky *et al.*, 2003).

Este grupo presenta un dominio Dof conservado de 52 residuos de cisteína con un único dedo C2-C2 de zinc; el cual coordina tanto las interacciones proteína-proteína como los procesos de unión al ADN, mediante el reconocimiento de elementos CREs (*-cis-regulatory elements*) conteniendo la secuencia 5'-AAAG-3' en el promotor de sus genes diana (Moreno-Risueno *et al.*, 2007).

La identificación de diferentes miembros de esta familia en plantas superiores los ha asociado a diversos procesos fisiológicos tales como asimilación de carbono fotosintético y nitrógeno,

desarrollo y formación de semillas, floración, dormancia, respuesta a fitohormonas, luz o estrés oxidativo entre otros (Yanagisawa, 2000, 2004; Tepperman *et al.*, 2001; Lijavetzsky *et al.*, 2003; Moreno-Risueno *et al.*, 2007; Rueda-López *et al.*, 2008). Igualmente se ha confirmado su papel en los procesos de transcripción. Por ejemplo, MNB1/ZmDOF1, el primer Dof aislado en maíz regula, conjuntamente con Dof2, la expresión del gen que codifica la C4-fosfoenol-piruvato-carboxilasa (Yanagisawa y Sheen, 1998) inducida por luz en tallos y hojas de manera constitutiva. De manera específica, Dof y los FTs CDF (*Cycling Dof Factor*) están involucrados en la regulación negativa del FT Constans (*CO*), y en última instancia relacionados con la proteína nuclear Gigantea (*GI*), asociada al proceso de floración tardía en *Arabidopsis* sp. (Fornara *et al.*, 2009).

Sin embargo, en algas, poco se sabe del papel que estos FTs representan en la funcionalidad de los genes. De manera puntual, se ha caracterizado el gen *CrDof* en el alga verde *C. reinhardtii*, relacionándose con la germinación del cigoto, el cual no ocurre en ausencia de luz (Moreno-Risueno *et al.*, 2007).

Otros elementos implicados en la expresión de genes relacionados con la luz son los FTs *Apetala1* (*AP1*) o *Flowering Locus C* (*FLC*), los cuales se comportan como promotores o represores de la floración bajo diferente FP. Estos genes son insensibles a las condiciones inductoras de FP corto, pero sufren un retraso severo de la floración en condiciones de FP de día largo (Putterill *et al.*, 1995; Aukerman *et al.*, 1997; Michaels y Amasino, 1999; El-Assal *et al.*, 2001; Searle y Coupland, 2004; Werner *et al.*, 2005; Balasubramanian *et al.*, 2006a,b). En este sentido, la floración representa la transición a una etapa reproductiva, la cual va precedida además por el paso del estado juvenil al estado adulto. Así se ha comprobado que, durante la etapa juvenil, la planta es insensible a diferentes tipos de estímulo, como el FP, y es incapaz de iniciar el proceso reproductivo (Matsoukas *et al.*, 2012; Sgamma *et al.*, 2014). Sin embargo y bajo las condiciones de inducción adecuadas, el vegetal será capaz de responder a dichos estímulos, integrar todas las señales y comenzar la transición a la etapa reproductiva. Una vez que este cambio tiene lugar, la activación e incremento de diversos componentes como miR172 y diversos FTs tipo Squamosa (*SPL2/4/5*), activan FTs en las hojas a través de la represión de Schalafmütze (*SMZ*), Schnarchzapfen (*SNZ*) y Target of eat 1-3 (*TOE1-3*), de esta manera el proceso de floración comienza.

Por otro lado, la subfamilia RAV (Zhuang *et al.*, 2011), perteneciente a la familia AP2/EREB, presenta la capacidad para regular genes en respuesta a luz tanto de manera individual como de manera coordinada con otros inductores. Específicamente, el estudio y análisis funcional de RAV1 ha permitido su clasificación como regulador positivo en el envejecimiento folial, alcanzando un máximo de expresión en fases tempranas e incrementando

de manera notable el número de transcritos tras la exposición a inductores tales como el etileno o el metil jasmonato (Woo *et al.*, 2010). Asimismo, ciertas proteínas RAV (p.e: las proteínas TEM, que codifican los genes *Tempranillo* (TEM)), se comportan como represores de manera independiente al estímulo recibido, mostrando que tanto bajo condiciones de cultivo inductoras (16 h luz: 8 h oscuridad) como no inductoras (16 h oscuridad: 8 h luz), la floración se ve reprimida. Ello sugiere la implicación de más de una vía de regulación a nivel transcripcional.

Otro de los grupos más importante de motivos identificados son aquellos relacionados con la regulación por rutas de señalización hormonales. En este caso, es importante puntualizar que como se ha mencionado i) ninguno de los FTs identificados presenta un papel exclusivo en un proceso determinado, ii) no responden de manera única a un estímulo concreto, y iii) no son específicos de un gen determinado, sino que más bien y como se ha mencionado previamente, la respuesta a nivel génico que desencadenan depende del cómputo global de múltiples condiciones, afectando incluso múltiples vías metabólicas de manera simultánea (Phukan *et al.*, 2017). En este sentido, los elementos implicados rara vez funcionan de manera independiente, al igual que ocurre en los organismos, donde rara vez, un proceso es resultado de un solo condicionante.

Mas aún, la escasez de trabajos específicos en algas en relación a los factores hormonales que afectan sus procesos metabólicos supone un hándicap añadido a la ya de por sí intrincada tarea de validar los resultados y establecer pautas generales. No obstante, esta situación nos ofrece un marco de trabajo increíblemente amplio para futuras investigaciones. Al respecto, algunos FTs encontrados en plantas superiores como *Agamous* o *AGL3*, pertenecientes a la familia MADS están implicados en la respuesta celular a auxinas, en el desarrollo floral y en diversos aspectos del desarrollo.

Sin embargo, los resultados en algas de nuevo no muestran consenso ya que si bien es cierto que algunos genes de esta familia (MADS) han sido identificados en especies de algas verdes carofitas (Tanabe *et al.*, 2005), los estudios *in silico* en base a las secuencias depositadas parecen no identificarlos. También se ha propuesto que la presencia de esta familia concreta de FTs podría no tener igual significancia que en plantas superiores sugiriendo por tanto la necesidad de estudios mas exhaustivos (Riaño-Pachón *et al.*, 2008).

Finalmente y dentro de este grupo de FTs relacionados con la señalización hormonal, destacamos aquellos con capacidad reguladora en respuesta a los compuestos volátiles etileno (ET) y metil jasmonato (MeJa).

La capacidad del etileno para actuar como una fitohormona y afectar múltiples procesos en plantas superiores, tanto a nivel fisiológico como molecular, lo ha convertido en uno de los volátiles más comúnmente estudiados. Múltiples elementos se han identificado como 'receptivos' a su estímulo, destacando *Abi4*, *SMZ* y *RAV*. Como se ha mencionado, *RAV* y *SMZ* ya han sido previamente relacionados con la inducción por luz, lo que demuestra la naturaleza multifuncional de los mismos.

*RAV* (*Related to ABI3/VP*), *SMZ* y *Abi 4* forman parte de la superfamilia AP2/EREB, en algunos casos también referida como AP2/ERF (*APETALA2/Ethylene Responsive Factor*). De manera general, su estudio en diferentes plantas superiores ha demostrado su implicación en la regulación de respuestas bióticas y abióticas ante diversos tipos de estrés, el ET, el ABA o diferentes azúcares (Nakano *et al.*, 2006; Sharoni *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2011; Mizoi *et al.*, 2012; Licausi *et al.*, 2013; Marcolino-Gomes *et al.*, 2013; Thamilarasan *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2015).

*Abi4* es capaz de responder a ET, aunque su función principal se ha relacionado de manera directa con la vía metabólica de ABA y la regulación de azúcares (Finkelstein *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 2009). *Abi4* es un elemento no específico que aparece en distintas partes del genoma afectando la expresión de diversos genes (Nakano *et al.*, 2006; Licausi *et al.*, 2013) mediante la unión con el elemento regulador en *-cis* -CCAC o con la secuencia -CACCG (Bossi *et al.*, 2009). Concretamente, se ha visto como en presencia de glucosa, su expresión se ve alterada, incrementándose de manera notable y siendo dependiente de secuencias cortas localizadas en la región 5' del gen (Arroyo *et al.*, 2003). Asimismo, la identificación de lugares potenciales de unión, en regiones cercanas a genes regulados por ABA y/o azúcares en organismos diversos tales como maíz, arroz o cebada; sugiere una implicación directa como activador de la transcripción y como regulador positivo de su propia expresión (Bossi *et al.*, 2009).

La regulación combinada de las vías de ABA y azúcares durante las primeras etapas del desarrollo en maíz por parte de *Abi4* parece influir de manera determinante en la transición de la etapa juvenil a la adulta (Niu *et al.*, 2002), y por tanto la transición a la etapa reproductiva (revisado en Gazzarrini y McCourt, 2001; Leon y Sheen, 2003).

Otro de los grupos de FTs identificados en este trabajo son los MYCs, pertenecientes a la familia bHLH e implicados en la respuesta al MeJa. La familia bHLH se caracteriza por la presencia del dominio conservado bHLH, el cual está formado por unos 60 aminoácidos aproximadamente, con dos regiones funcionales bien distinguidas. La mayoría de proteínas bHLH son capaces de reconocer y unirse a la secuencia consenso conocida como 'caja E' (5'-CANNTG-3') o 'caja G' (5'-GACGTG-3') (Kang *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis* sp., las proteínas MYC son la clase más abundante y se ha comprobado su implicación en procesos de diferenciación y proliferación celular. Asimismo, su facultad para interactuar con el ácido jasmónico (JA) y derivados (jasmonatos) favorece la expresión de los genes de defensa y activa la producción de metabolitos secundarios como respuesta de la planta ante patógenos y herbivoría (Delgado-Cerezo, 2012; Schweizer *et al.*, 2013). Asimismo, estas proteínas han sido identificadas como señalizadoras en diferentes cascadas de regulación; generando una respuesta como activadoras o represoras de distintos genes (Delessert *et al.*, 2005; Bu *et al.*, 2008). Entre los genes regulados positivamente se encuentran aquellos relacionados con la respuesta a herida, biosíntesis de antocianinas y flavonoides, inhibición del crecimiento de la raíz y biosíntesis del JA; mientras que aquellos reprimidos están involucrados en la respuesta defensiva frente a bacterias y patógenos necrótrofos (Boter *et al.*, 2004; Schweizer *et al.*, 2013). Los MYCs están a su vez regulados por las proteínas represoras JAZs (JAZ: *Jasmonates Zim-domain protein*), las cuales reducen la capacidad de activación de defensas de la planta (Fernández-Barbero, 2015).

De manera específica y relacionados con el proceso reproductivo, el FT MYC5 se ha relacionado con la esterilidad masculina de plantas, comprometiendo la elongación de los filamentos del estambre y la viabilidad del polen y ocasionando la dehiscencia de las anteras (Figueroa y Browse, 2015).

En algas no se han encontrado referencias sobre la identificación o funcionalidad de este tipo de elementos. Si bien es cierto que el compuesto MeJa fue descubierto en plantas superiores en la década de los años 60, los trabajos sobre sus vías de síntesis y regulación en plantas superiores son relativamente recientes y, en consecuencia, el conocimiento en algas es aún incipiente.

En vista de lo expuesto, parece que los elementos reguladores identificados en la región 5' del gen *GiODC* en respuesta a estímulos por luz (PIFs y Dof), etileno (Abi 4, SMZ y RAV) y metil jasmonato (MYCs) juegan un papel importante en la regulación de numerosos aspectos en plantas superiores. Si bien es cierto que su función en algas es a día de hoy incierta, podríamos inferir *a priori* un comportamiento o modo de actuación similar a lo observado en vegetales terrestres. Más aún y como se discutirá más adelante, los resultados de expresión de *GiODC* muestran un claro comportamiento diferencial en función del tipo de tratamiento inductor lo que sugiere de manera inequívoca vías de regulación y señalización sensibles a los mismos. Indudablemente, la realización de estudios que corroboren esta hipótesis es necesaria; sin embargo, creemos que los resultados obtenidos representan una buena aproximación de partida y establecen los principios para un marco de trabajo futuro relacionado con estos TF y su implicación en la fisiología de las algas rojas.

### 3. Estructura nucleotídica de la 5' UTR de diferentes genes *ODC*

El ensamblaje de la secuencia obtenida, su posterior identificación a través del programa Blastn como *GiODC* y la consiguiente identificación *in silico* de motivos reguladores a través de las distintas bases de datos mostradas en la tabla 13, sugieren que la expresión del gen *GiODC* podría estar controlada por uno o más de estos factores. No obstante, poca información referente al papel de los FTs existe para algas y menos aún para macroalgas rojas.

La carencia de genomas completos y por tanto la disponibilidad de secuencias moleculares de estos organismos dificulta enormemente el proceso de identificación, comparación y validación de los resultados pero es un reto que a partir de la experiencia previa puede afrontarse.

De manera general, el reconocimiento de la importancia de los FTs, principalmente en plantas superiores, como elementos capaces de modificar y regular la expresión de un gen a nivel transcripcional, ha fomentado el desarrollo y aplicación de métodos experimentales y computacionales para la identificación de los mismos, así como, de sus diferentes secuencias o sitios de unión en el genoma (Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009). La caracterización de FTs mediante análisis *in silico* ha sido llevada a cabo en las microalgas verdes *C. reinhardtii*, *Volvox cartierii* y *Nannochloropsis* sp. y en la microalga roja *Galdieria sulphuraria* (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2012; Vieler *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014). Específicamente, un análisis del genoma de tres estirpes de *Nannochloropsis* (*N. oceanica* IMET118, *N. oceanica* CCMP177916 y *N. gaditana* CCMP526) ha revelado la presencia de 125, 119 y 85 FTs respectivamente, comprendidos en su mayoría dentro de las familias MYB, bZIP, MYB a NF-YC (Hu *et al.*, 2014).

De manera general, se acepta que el grado de similitud u ocurrencia de las familias de FTs refleja la relación filogenética entre especies (Riechmann *et al.*, 2000), y paralelamente, sugiere mecanismos de regulación génica similares. No obstante, es importante considerar, que estas herramientas, aunque útiles como primera aproximación, se encuentran supeditadas al conocimiento molecular actual, aún pendiente de estudio.

Con esto en mente, se empleó el servidor Jaspas Core Plantae para detectar la presencia de motivos conservados en las diferentes secuencias correspondientes al gen *ODC*, para distintos organismos, recopiladas a través de la base de datos UTRdb. El resultado mostró existencia de los mismos en los diferentes grupos con un valor de corte del 85% (Tabla 22).



Tomando como base los motivos seleccionados (*Abi4*, *SMZ*, *RAV*, *PIFs*, *Dof* y *MYCs*) en la 5' UTR de *GiODC*, se ha observado como el resto de regiones 5' de los organismos retraídos de la base de datos presentan al menos uno de ellos, lo que sugiere que la región 5' UTR-*ODC* comparte rasgos comunes incluso en organismos distantes filogenéticamente. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que los FTs se encuentran presentes en diferentes grupos taxonómicos. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, al menos 1.500 genes diferentes codifican para FTs, de los cuales, aproximadamente el 45% se engloban en familias presentes también en otros organismos como *C. elegans*, *D. melanogaster* y *S. cerevisiae*, entre otras (Riechmann *et al.*, 2000). Este hecho indica una amplia distribución de estos elementos reguladores y por tanto, su ocurrencia en *G. imbricata* podría parecer altamente probable.

De la misma manera, diversos FTs han sido identificados y se ha comprobado su papel en procesos fisiológicos variados comunes en animales, plantas y hongos (Bellaoui *et al.*, 2001; Palma *et al.*, 2007). La presencia/ausencia de algunos de los motivos podría explicarse en base a diferentes razones: i) no se conoce la totalidad del genoma de todos los organismos por lo que podrían no haberse identificado a día de hoy, o su función no ha sido caracterizada (Zhang *et al.*, 2012), y ii) las historias evolutivas posteriores a la etapa unicelular han ocurrido de manera diferente en animales y plantas.

Un estudio comparativo del genoma de 32 organismos, ha revelado además que los genomas de plantas codifican más FTs que los genomas animales y los casos de duplicación son comunes (revisado en González, 2016). Estas diferencias se han asociado en parte a los distintos tipos de tejidos presentes: mientras que los tejidos animales presentan células altamente especializadas, con funciones específicas y altamente reguladas para minimizar al máximo la necesidad de un aporte energético exterior; las plantas poseen sus propios sistemas celulares para la obtención de energía de manera autónoma (González, 2016). De manera simultánea, existen organismos como la ameba *Dictyostelium discoideum*, la cual es capaz de generar la agregación de células individuales conformando un tejido multicelular en el cual diferentes conjuntos de células se diferencian y especializan en una función concreta. Este comportamiento altamente estructurado y organizado, similar a lo que ocurre en animales, es asimismo reflejado en las características de su genoma, donde los FTs presentes muestran un patrón intermedio entre plantas y animales (Fukuzawa, 2011; Loomis, 2014). Por tanto, parece complicado establecer un patrón o explicación común a la presencia/ausencia de estos elementos que, a su vez, sea válido para todos ellos. No obstante, lo que si es evidente es que aquellos pertenecientes al mismo grupo taxonómico presentan mayor

similitud entre ellos que con el resto, lo que apoya que las diferencias mostradas sean resultado de la divergencia evolutiva.

El árbol filogenético realizado (Fig. 12) agrupa las secuencias pertenecientes al mismo grupo más próximas entre sí; resultado evidente que parece confirmar lo esperado a la hora de establecer una relación de similitud a partir de secuencias correspondientes al mismo gen: que aquellos organismos, en este caso secuencias, más similares se encuentren más cercanos. En este caso nuestro enfoque es inferir una posible similitud estructural que pudiese dar una idea inicial del comportamiento funcional derivado de la ocurrencia de alguno de estos elementos.

Asumiendo que las secuencias presentan cierta homología y tras la identificación de algunos motivos conservados, se espera que aquellas secuencias correspondientes a los individuos de grupos taxonómicos iguales o más cercanos presenten ramas más cercanas. De manera coincidente se observa cómo las ramas del árbol se organizan de forma más próxima para organismos del mismo grupo, con la excepción del hongo *P. infestans*, el cual se aleja de *A. dermatitidis* y *P. marneffreii* y se acerca a *G. imbricata*. Mientras que *P. infestans* (Oomycetes) es un protista fungoide parásito principal de plantas, *A. dermatitidis* y *P. marneffreii* afectan normalmente a roedores y humanos, por lo que la separación entre sus ramas sugiere un empleo diferente de las rutas metabólicas ocasionado quizás, por la mutación y la pérdida y/o ganancia de función de alguno de estos FTs, el cual puede haber variado la secuencia nucleotídica del gen y por consiguiente su estructura y, previsiblemente, su funcionalidad.

En consecuencia, parece evidente que la distribución de estos elementos es variable incluso dentro de un grupo determinado por lo que, al igual que ocurre con la identificación *in silico* de los mismos a través de los programas informáticos, establecer una relación directa entre su ocurrencia y su posible función a día de hoy es meramente teórica. En este caso, además se observa que el desconocimiento actual existente en referencia a las secuencias, los elementos que contienen y las diferentes vías de actuación que se establecen entre ellas y rigen los diferentes procesos fisiológicos no es algo limitado únicamente a algas sino que deja entrever que aún existen muchas preguntas que deben ser respondidas. Por ende, la similitud en los patrones de diferentes FTs observados para plantas y animales sugiere, que si bien es cierto que en este momento no se pueden establecer teorías concluyentes, los avances en este campo podrían aportar luz en otros sistemas y contribuir a un mayor conocimiento general.

#### 4. Análisis de la expresión diferencial de *GiODC* bajo diferentes tratamientos inductores de la carposporogénesis

El gen *ODC* es un gen ubicuo implicado en numerosos procesos de viabilidad y proliferación celular. Aunque escasos, algunos estudios sobre el comportamiento del gen *ODC* se han desarrollado en plantas superiores. De manera específica, su expresión ha sido investigada en la planta del tomate (*Lycopersicon esculentum*) en la cual se ha determinado que existe expresión diferencial en función del tejido. Así en material polinizado, el máximo de expresión tiene lugar a los 8 días después de la floración, mientras que durante el desarrollo partenocárpico de ovarios no polinizados, se observa un alto número de transcritos un día después de la floración. Asimismo, este nivel de expresión disminuye de manera gradual con el tiempo. Paralelamente, cuando el tejido no polinizado fue tratado con los inductores  $GA_3$  y 2,4-D con el objetivo de observar posibles diferencias en expresión, se mostraron máximos de expresión a los 5 y 8 días posteriores a la floración. Estos resultados demuestran, por un lado, una correlación positiva entre los niveles de expresión de *ODC* y la presencia de un tejido joven en división (Alabadí y Carbonell, 1998). Por otro lado, la influencia de los inductores en la expresión del mismo denota la capacidad de alterar la expresión de manera cuantitativa y temporal. No obstante, este patrón difiere con lo observado en guisante, donde la expresión de *ODC* no ha podido ser detectada (Pérez-Amador *et al.*, 1995).

La búsqueda bibliográfica no ha mostrado trabajos previos sobre los patrones de expresión del gen *ODC* en algas en relación al proceso reproductivo tras la inducción con diferentes tratamientos, a excepción de los previamente referidos para *G. imbricata* (García-Jiménez *et al.*, 2009; Montero-Fernández *et al.*, 2016). En este sentido de nuevo se pone de manifiesto la escasez de conocimiento actual sobre los procesos reproductivos en algas y en particular en macroalgas rojas y por tanto, el establecimiento de marcadores génicos que nos indiquen los cambios que acontecen durante eventos morfo-fisiológicos.

El establecimiento del gen *GiODC* como gen candidato de la reproducción de las algas rojas es sustentado por los resultados obtenidos por nuestro equipo de investigación y los resultados aportados en este trabajo. La monitorización de la expresión durante el proceso de maduración *in vitro* de los cistocarpos sin duda representa una buena herramienta para abordar el estudio de dicho proceso.

El tratamiento con diferentes inductores de la reproducción afecta la expresión de *GiODC* de manera recurrente. Así, los resultados de expresión del gen *GiODC* muestran dos patrones diferenciales atendiendo al tiempo (*elicitation period* vs *disclosure period*), y al tipo de inductor (Tabla 23).

En referencia a la temporalidad de la expresión, se observa como los niveles de transcritos se acumulan, tanto para los tratamientos de fotoperiodo de día largo y de etileno, justo tras el periodo de inducción: finalizado el tratamiento y cuando las estructuras reproductoras no son visibles (Tabla 23).

Estos niveles decaen de manera notoria tras la formación de los cistocarpos (Tabla 23). Este resultado es coincidente con los estudios obtenidos por García-Jiménez y colaboradores en 2009, donde el nivel de expresión de *ODC* disminuye según aumenta el grado de desarrollo y maduración de las estructuras reproductoras avalados por ISH y PCR cuantitativa.

De manera opuesta, el tratamiento con MeJa presenta un máximo de expresión a las 48 h una vez que las estructuras reproductivas aparecen (Tabla 23).

Este patrón en el cual existe expresión diferencial en función del grado de maduración del tejido ha sido comúnmente observado en plantas superiores. Por ejemplo, el pericarpio de la especie frutal *Litchi chinensis* experimenta varias fases durante su ciclo de vida las cuales llevan asociadas cambios fisiológicos que conducen a la coloración diferencial de la superficie del fruto, estableciéndose tres fases claramente distinguibles (verde-amarilla, amarilla-roja, verde-roja). En este sentido, los estudios de expresión realizados demostraron que, de los aproximadamente 34.705 genes examinados, 3.649 se expresaban de manera significativa entre cualquiera de las dos fases de coloración: 1.800 entre la verde-amarilla, 1.241 entre la amarillo-rojo y 2.514 entre verde-rojo. Asimismo, 156 genes mostraban expresión diferencial durante las tres etapas de coloración (Lai *et al.*, 2015).

En cuanto al tipo de regulador, se observa cómo la expresión génica también se ve alterada por el inductor de las estructuras reproductoras (Tabla 23). Si estableciéramos un orden de inductores con mayor influencia en la reproducción de las algas, fotoperiodo, metil jasmonato y etileno supondría la ordenación de menor a mayor afectación de la expresión del gen. Como hemos mencionado, el efecto del FP sobre diferentes aspectos de la fisiología de *G. imbricata* ha sido previamente establecido a nivel de cultivo *in vitro*. Igualmente, la identificación *in silico* de motivos reguladores en la zona 5' UTR del gen *ODC* dependientes del fotoperiodo de alguna manera también infiere el papel que estos puedan tener en la fisiología. No resultaría descabellado, pensar que la expresión de un gen candidato se vea alterada si los factores de transcripción que controlan a este gen están también controlados por el compuesto inductor del evento.

En este sentido por ejemplo, en arroz se han identificado dos genes, *SNORKEL1 (SK1)* y *SNORKEL2 (SK2)*, los cuales son capaces de elongar sus internodos de manera proporcional a la profundidad a la que crecen y presentan FTs del tipo AP2/ERF (respuesta al ET) en su estructura. El tratamiento inductor con diferentes fitohormonas: ET, GA, BR (brasinosteroides), IAA (auxinas), CK (citoquininas) y ABA, mostró que únicamente el ET afectaba de manera significativa la expresión de los mismos, sugiriendo que los genes *SK* podrían actuar como FTs en la vía de señalización y regulación del ET (Hattori *et al.*, 2009).

Por otro lado, el incremento de expresión (450 veces superior) generado por el ET con respecto a los controles, parece indicar que *G. imbricata* es capaz de detectar la presencia de etileno y producir una respuesta rápida y eficiente ante el estímulo.

Si bien es cierto que en plantas superiores las rutas de detección y señalización del etileno han sido ampliamente estudiadas y se conoce de manera precisa la estructura de los receptores, en macroalgas rojas esta estructura no ha sido identificada como tal. Hasta el momento los acercamientos llevados a cabo por nuestro grupo tanto a nivel de cajas conservadas como de secuenciación masiva del transcriptoma han sido infructuosos (García-Jiménez y Robaina, 2017, *en prensa*). Parece asumible que esta respuesta sea resultado de la señalización por cascadas de las proteínas quinasa. Las proteínas quinasa son consideradas en muchos casos como transductores de señales gracias a su capacidad para modificar otras proteínas mediante la fosforilación del grupo hidroxilo de las mismas y la activación de diferentes rutas de señalización da lugar a una amplia variedad de respuestas celulares, tales como la respuesta a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Zou *et al.*, 2010). De igual manera, es posible que distintos reguladores como el ácido abscísico, las auxinas o el propio ET empleen este tipo de rutas para inducir respuestas regulatorias transcripcionales. En este sentido, son muchos los trabajos existentes sobre el papel regulador del ET vía fosforilación de proteínas MAP quinasa (MAPKK) en diferentes especies vegetales como el guisante (*Pisum sativum*; Berry *et al.*, 1996), en tabaco (*Nicotiana tabacum*; Raz y Fluhr, 1993) o *Arabidopsis* sp. (Novikova *et al.*, 2000); las cuales a su vez desencadenan distintas respuestas ante el estímulo.

Así por ejemplo, se ha visto como el estudio de 6.000 genes en *Arabidopsis* sp. revela expresión diferencial en respuesta al ET. Numerosos genes entre los que destacan algunos de la propia ruta biosintética del ET, genes de defensa, FTs varios o genes pertenecientes a diferentes rutas metabólicas tales como las auxinas, jasmonatos o azúcares, son regulados transcripcionalmente por este volátil; sustentando su naturaleza inductora a nivel molecular (Van Zhong y Burns, 2003).

Aunque no es posible aseverarlo, parece probable que las algas, organismos sujetos a condiciones ambientales variables, empleen este tipo de vías señalizadoras, las cuales permiten una respuesta rápida ante un ambiente sujeto a condiciones variables.

En el caso del metil jasmonato sin embargo, la tendencia es opuesta y el máximo de expresión se corresponde con la aparición de las estructuras reproductoras por lo que parece ser necesario un periodo de ‘adaptación o transición’ cuya respuesta sea resultado de la activación de diferentes vías. El MeJa es un compuesto lipídico derivado del ácido jasmónico, perteneciente al grupo de las oxilipinas y generalmente conocidos como jasmonatos. En plantas superiores se ha comprobado su implicación en multitud de procesos fisiológicos como inductores en la obtención de compuestos de interés y metabolitos secundarios (Sivanandhan *et al.*, 2013) así como en la regulación de procesos de desarrollo; tales como inhibición del crecimiento, senescencia, formación de tricomas, producción y maduración de gametos, respuesta ante diferentes tipos de estrés abiótico y biótico (Boughton *et al.*, 2005; Pauwels *et al.*, 2008, 2009; Zhang y Turner, 2008; Reinbothe *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011; Depuydt y Hardtke, 2011). Su ruta de síntesis está bien establecida en plantas superiores y numerosos trabajos versan sobre las diferentes vías de actuación, regulación transcripcional y genes implicados. De esta manera se ha determinado que el jasmonato se sintetiza a partir de la actividad de lipooxigenasas que desencadenan una ruta altamente compleja y dónde diversas familias de enzimas se encuentran involucradas.

Asimismo, a nivel molecular, los jasmonatos presenta capacidad para alterar la expresión de diversos genes en plantas superiores. Por ejemplo y de manera muy general, uno de los aspectos mejor estudiados en relación a estos compuestos es la respuesta defensiva mostrada por los vegetales frente al ataque por patógenos. En este sentido, se ha observado como ante el daño ocasionado por insectos ocurre un aumento en la producción de jasmonatos a través de la activación de una amplia variedad de genes dependientes del JA, tales como FTs (p.e: MYC2), enzimas para la síntesis de metabolitos secundarios, genes *JAZ* o genes involucrados en la ruta de síntesis del JA como *LOX2*, *AOS*, *OPR3* o *JAR1* (Reymond *et al.*, 2004; De Vos *et al.*, 2005; Devoto *et al.*, 2005; Dombrecht *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008).

De manera adicional al papel que desempeñan estas sustancias en la respuesta defensiva, se ha comprobado su implicación en la regulación génica en relación a diferentes procesos fisiológicos, tales como la la formación de tricomas o la producción de antocianinas en respuesta a distintos tipos de estrés entre otros (Zhao *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011).

No obstante, el conocimiento actual en algas difiere a ese de plantas superiores. Por ejemplo, se ha observado su implicación en diferentes aspectos fisiológicos principalmente en microalgas como *Chlorella vulgaris* donde afecta su desarrollo y crecimiento (Czepak *et al.*, 2006), en *Scenedesmus incrassulatus* (Christov *et al.*, 2001) o más recientemente en *Schizochytrium mangrovei* donde su aplicación externa estimula la síntesis de compuestos antioxidantes (Yue y Jiang, 2009) o *Haematococcus pluvialis* (Lu *et al.*, 2010). De manera específica se ha visto cómo la aplicación exógena de este compuesto reduce *in vitro* el tiempo de formación y maduración de los cistocarpos en *G. imbricata* a la vez que produce un aumento en el número de estas estructuras y produce su apertura. Asimismo, se ha comprobado que este efecto es resultado directo del tratamiento inductor, ya que en oposición, las muestras tratadas con fenidona, un inhibidor del mismo, muestran una menor presencia de estructuras reproductoras (García-Jiménez *et al.*, 2016). En este sentido, parece evidente que el MeJa juega un papel regulador en diferentes aspectos del metabolismo de las algas, y los resultados obtenidos para *GiODC* refuerzan su papel como inductor en el proceso reproductivo, aunque a día de hoy, los mecanismos y rutas por las cuales actúa necesitan ser dilucidadas.

Parece por tanto, que la monitorización de *GiODC* durante la carpoesporogénesis representa una buena aproximación para el estudio de los cambios que ocurren a nivel molecular relacionados con la transición a una etapa reproductiva en algas rojas. A pesar del escaso conocimiento que existe para estos organismos, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que i) el gen *ODC* en *G. imbricata* muestra expresión diferencial en función del tipo de inductor y, ii) en función del grado de desarrollo del tejido; lo que apoya la hipótesis de este gen como candidato de la reproducción en algas rojas.

A modo de conclusión, parece por tanto que diferentes señales son capaces de activar o afectar el proceso reproductivo en algas rojas, a la vista de lo observado tras los diferentes tratamientos inductores, en este caso fotoperiodo, etileno y metil jasmonato. Asimismo, la interconexión entre las diferentes vías de regulación parece probable aunque es evidente que se necesitan nuevas investigaciones que lo verifiquen. Al respecto, los resultados aquí expuestos establecen una base para futuros estudios.

## Conclusiones

- En este capítulo y mediante la implementación de la técnica de amplificación inversa de la polimerasa (iPCR) se ha conseguido obtener parte de la región 5' correspondiente al gen *ODC* de la macroalga roja *Grateloupia imbricata* (*GiODC*).
- El estudio y análisis *in silico* de la 5' UTR, a través de diferentes bases de datos, ha dado como resultado la identificación de diversos motivos y elementos reguladores contenidos en la misma. De acuerdo a la bibliografía, estos elementos han sido clasificados en distintas familias proteicas de factores de transcripción implicados en procesos fisiológicos y metabólicos vegetales. Seis de ellos, presentan un potencial papel para afectar de manera directa la expresión de *GiODC* en respuesta a tratamiento con inductores tales como fotoperiodo, etileno o metil jasmonato.
- La identificación de estos factores en otras regiones 5'- *ODC* de diferentes especies parece corroborar la capacidad reguladora de los mismos, y la identidad de la secuencia obtenida.
- Aunque estos resultados *in silico* necesitan ser validados de manera experimental, la identificación de elementos con capacidad reguladora suponen un punto de partida para el estudio de la regulación transcripcional mediada por factores de transcripción en *GiODC*.
- Los resultados de expresión diferencial del gen de la ornitina descarboxilasa durante el desarrollo *in vitro* del cistocarpo revelan la importancia del tipo de inductor y del estado fisiológico del material, y ponen de manifiesto la capacidad de señalización de *GiODC* bajo diferentes condiciones experimentales, reforzando la hipótesis de gen candidato en la señalización y determinación del proceso de carpoesporogénesis en algas rojas.



## Bibliografía

- Abbasi, B.H., Stiles, A.R., Saxena, P.K. y Liu, C.Z. 2012. Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots. *Appl. Biochem. Biotech.* Vol. 168(7): 2057 -2066.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. y Shinozaki, K. 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell.* Vol. 9: 1859-1868.
- Agrawal, S.C. 2012. Factors controlling induction of reproduction in algae. *Folia Microbiol.* Vol. 57: 387-407.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R. y Yadav, R. C. 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* Vol. 19 (3): 307-321.
- Adamczyk, B.J., Lehti-Shiu, M.D. y Fernyez, D.E. 2007. The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J.* Vol. 50: 1007-1019.
- Alabadí, D. y Carbonell, J. 1998. Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol.* Vol. 118(1): 323-328.
- Algarra, P., de la Vina, G. y Niell, J. 1991. Effects of light quality and irradiance level interaction on short-term pigment response of the red alga *Corallina elongata*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* Vol. 74: 27-32.
- Al-Qasbi, M. 2012. A review of effect of light on microalgae growth. *Proceedings of the World Congress on Engineering.* Vol I.
- Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R. y León, P. 2003. Three genes that affect sugar sensing: *ABA INSENSITIVE4*, *ABA INSENSITIVE5* and *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1*, are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* Vol. 133: 231-242.
- Aukerman, M.J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clack, T., Amasino, R.M. y Sharrock, R.A. 1997. A deletion in the *PHYD* gene of the *Arabidopsis wassilewskija* ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell.* Vol. 9(8): 1317-1326.
- Badini, L., Pitocchi, R. y Bagni, N. 1994. Polyamine transport in the seaweed *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Phycol.* Vol. 30: 599-605.
- Bais, H.P. y Ravishankar, G.A. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* Vol. 69: 1-34.

- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Agrawal, M., Michael, T.P., Wessinger, C., Maloof, J.N., Clark, R., Warthmann, N., Chory, J. y Weigel, D. 2006a. The *PHYTOCHROME C* photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* Vol. 38(6): 711-715.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J. y Weigel, D. 2006b. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLOS Genet.* Vol. 2(7): e106.
- Banerjee, A.K. 1980. 5'-terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* Vol. 44: 175-205.
- Barrett, L.W., Fletcher, S. Y Wilton, S.D. 2013. Untranslated gene regions and other non-coding elements regulation of eukaryotic gene expression. En *Biochemistry and Molecular Biology*. Springer. Basel Heidelberg New York Dordrecht London.
- Baweja, P., Sahoo, D., García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2009. Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: problems, achievements and prospects. *Phycol. Res.* Vol. 57: 45-58.
- Bellaoui, M., Pidkowich, M.S., Samach, A., Kushalappa, K., Kohalmi, S.E., Modrusan, Z., Crosby, W.L. y Haughn, G.W. 2001. The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell.* Vol. 13(11): 2455-2470.
- Bercovich, Z., Rosenberg-Hasson, Y., Ciechanover, A. y Kahana, C. 1989. Degradation of ornithine decarboxylase in reticulocyte lysate is ATP-dependent but ubiquitin-independent. *J. Biol. Chem.* Vol. 264: 15949-15952.
- Berry, A.W., Cowan, D.S.C., Harpham, N.V.J., Hemsley, R.J., Novikova, G.V., Smith, A.R. y Hall, M.A. 1996. Studies on the possible role of protein phosphorylation in the transduction of the ethylene signal. *Plant Growth Regul.* Vol. 18: 135-141.
- Betancourt Fernández, L. 1997. Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp. 109201 aislada en aguas de Cuba. Tesis Doctoral. Universidad de A Coruña. España.
- Bianchi, M.E. y Agresti, A. 2005. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* Vol. 15: 496-509.
- Bitrián, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A.F., y Alcázar, R. 2012. Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. *Metabolites.* Vol. 2: 516-528.
- Bochenek, M., Etherington, G.J., Koprivova, A., Mugford, S.T., Bell, T.G., Malin, G. y Kopriva, S. 2013. Transcriptome analysis of the sulfate deficiency response in the marine microalga *Emiliania huxleyi*. *New Phytol.* Vol. 199: 650-662.
- Bornette, G. y Puijalón, S. 2011. Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. *Aquat. Sci.* Vol. 73: 1-14.

- Bossi, F., Cordoba, E., Dupré, P., Mendoza, M.S., San Román, C. y León, P. 2009. The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling. *Plant J.* Vol. 59(3): 359-374.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A. y Prat, S. 2004. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes Dev.* Vol. 18: 1577-1591.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. y Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* Vol. 140: 103-125.
- Boughton, A.J., Hoover, K., y Felton, G.W. 2005. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J. Chem. Ecol.* Vol. 31(9): 2211-2216.
- Brandt, P., Winter, J., von Kessel, B. y Kohnke, B. 1987. Regulation of chloroplast differentiation: cooperation between light-induced processes and internal adaptation. En *Algal Development: molecular and cellular aspects*. Ed: Wiessner, W., Robinson, D.G. y Starr, R.C. Springer -Verlag. Berlin Heidelberg.
- Bu, Q., Jiang, H., Li, C.B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q. y Li, C. 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res.* Vol. 18: 756-767.
- Carninci, P., Syelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A., Taylor, M.S., Engstrom, P.G., Frith, M.C., Forrest, A.R., Alkema, W.B., Tan, S.L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., Suzuki, H., Grimmond, S.M., Wells, C.A., Orlyo, V., Wahlestedt, C., Liu, E.T., Harbers, M., Kawai, J., Bajic, V.B., Hume, D.A. y Hayashizaki, Y. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* Vol. 38: 626-635.
- Casal, J.J. 2012. Shade avoidance. *Arabidopsis Book*. Vol. 10: e0157.
- Catriona, L.H., Harrison, P.J., Bischof, K. y Lobban, C.S. 1994. Seaweed ecology and physiology. Cambridge Press. England.
- Chen, P., Shao, H. y Xu, D. 2011. Cloning and characterization of a female gametophyte-specific gene in *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyte). *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 5: 2590-2595.
- Christov, C., Pouneva, I., Bozhkova, M., Toncheva, T., Fournadzieva, S. y Zafirova, T. 2001. Influence of temperature and methyl jasmonate on *Scenedesmus incrassulatus*. *Biol. Plantarum.* Vol. 44(3): 367-371.

Chung, H.S., Koo, A.J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D. y Howe, G.A. 2008. Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* Vol. 146: 952-964.

Cock, J.M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A.E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J.-M., Badger, J.H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet, E., Bothwell, J.H., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C.J., Charrier, B., Cho, G.Y., Coelho, S.M., Collén, J., Corre, E., Da Silva, C., Delage, L., Delaroque, N., Dittami, S.M., Doubeau, S., Elias, M., Farnham, G., Gachon, G.M.M., Gschloessl, B., Heesch, S., Jabbari, K., Jubin, C., Kawai, H., Kimura, K., Kloareg, B., Küpper, F.C., Lang, D., Le Bail, A., Leblanc, C., Lerouge, P., Lohr, M., Lopez, P.J., Martens, C., Maumus, F., Michel, G., Miranda-Saavedra, D., Morales, J., Moreau, H., Motomura, T., Nagasato, C., Napoli, C.A., Nelson, D.R., Nyvall-Collén, P., Peters, A.F., Pommier, C., Potin, P., Poulain, J., Quesneville, H., Read, B., Rensing, S.A., Ritter, A., Rousvoal, S., Samanta, M., Samson, G., Schroeder, D.C., Ségurens, B., Strittmatter, M., Tonon, T., Tregear, J.W., Valentin, K., von Dassow, P., Yamagishi, T., Van de Peer, Y. y Wincker, P. 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature.* Vol. 465: 617-621.

Coelho, S.M., Godfroy, O., Arun, A., Le Corguillé, G., Peters, A.F. y Cock, J.M. 2011. OUBO is a master regulator of the gametophyte to sporophyte life cycle transition in the brown alga *Ectocarpus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 108(28): 11518-11523.

Cohen, E., Heimer, Y.M. y Mizrahi, Y. 1982. Ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase activities in meristematic tissues of tomato and potato plants. *Plant Physiol.* Vol. 70(2): 544-546.

Cohen, E., Arad, S., Heimer, Y.H. y Mizrahi, Y. 1984. Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of *Chlorella*. *Plant Physiol.* Vol. 74: 385-388.

Collén, J., Hervé, C., Guisle-Marsollier, I., Léger, J.J. y Boyen, C. 2006. Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) after exposure to methyl jasmonate. *J. Exp. Bot.* Vol. 57(14): 3869-3881.

Collén, J., Guisle-Marsollier, I., Léger, J.J. y Boyen, C. 2007. Response of the transcriptome of the intertidal red seaweed *Chondrus crispus* to controlled and natural stresses. *New Phytol.* Vol. 176: 45-55.

Collén, J., Porcel, B., Carré, W., Ball, S.G., Chaparro, C., Tonon, T., Barbeyron, T., Michel, G., Noel, B., Valentin, K., Elias, M., Artiguenave, F., Arun, A., Aury, J.M., Barbosa-Neto, J.F., Bothwell, J.H., Bouget, F.Y., Brillet, L., Cabello-Hurtado, F., Capella-Gutiérrez, S., Charrier, B., Cladière, L., Cock, J.M., Coelho, S.M., Colleoni, C., Czjzek, M., Da Silva, C., Delage, L., Denoeud, F., Deschamps, P., Dittami, S.M., Gabaldón, T., Gachon, C.M., Groisillier, A., Hervé, C., Jabbari, K., Katinka, M., Kloareg, B., Kowalczyk, N., Labadie, K., Leblanc, C., Lopez, P.J., McLachlan, D.H., Meslet-Cladière, L., Moustafa, A., Nehr, Z., Nyvall Collén, P., Panaud, O., Partensky, F., Poulain,

- J., Rensing, S.A., Rousvoal, S., Samson, G., Symeonidi, A., Weissenbach, J., Zambounis, A., Wincker, P. y Boyen, C. 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 26: 5247-5252.
- Collén, J., Cornish, M. L., Craigie, J., Ficko-Bean, E., Hervé, C., Krueger-Hadfield, S.A., Leblanc, C., Michel, G., Potin, P., Tonon, T. y Boyen, C. 2014. *Chondrus crispus*. A present and historical model organism for red seaweeds. En *Advances in Botanical Research* (Sea Plants). Ed: Bourgougnon, N. Elsevier. Vol. 71.pp:53-89. London.
- Csvina, J.L., Stuart, B.J., Guy Riefler, R. y Vis, M.L. 2011. Growth optimization of algae for biodiesel production. *J. App. Microbiol.* Vol. 111: 312-318.
- Czerpak, R., Piotrowska, A., y Szulecka, K. 2006. Jasmonic acid affects changes in the growth and some components content in alga *Chlorella vulgaris*. *Acta Physiol. Plant.* Vol. 492(28): 195-203.
- Dautania, G. K. y Singh, G. P. 2014. Role of light and dark cycle and different temperatures in the regulation of growth and protein expression in *Oscillatoria agardhii* Strain. *Brad. Arch. Bill. Technol.* Vol. 57(6): 933-940.
- Day, D.A. y Tuite, M.F. 1998. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J. Endocrinol.* Vol. 15: 361-371.
- De Lucas, M. y Prat, S. 2014. PIFs get bright: phytochrome interacting factors as integrators of light and hormonal signals. *New Phytol.* Vol. 202: 1126-1141.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Van Loon, L.C., Dicke, M. y Pieterse, C.M. 2005. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.* Vol. 18: 923-937.
- Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I.W., Van Der Straeten, D., Manners, J., Dennis, E.S. y Dolferus, R. 2005. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* Vol. 43(5): 745-757.
- Delgado-Cerezo, M. 2012. Identificación y caracterización de la ruta mediada por la proteína G heterotrimérica de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta inmune. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Depuydt, S., y Hardtke, C.S. 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* Vol. 21(9): 365-373.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T. y Turner, J.G. 2005. Expression profiling reveals *CO11* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl

jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol.* Vol. 58: 497-513.

Dickson, L.G. y Waaland, J.R. 1985. *Porphyra nereocystis*: a dual-daylength seaweed. *Planta*. Vol. 165: 548-553.

Ding, J., Li, X. y Hu, H. 2012. Systematic prediction of *cis*-regulatory elements in the *Chlamydomonas reinhardtii* genome using comparative genomics. *Plant Physiol.* Vol. 160: 613-623.

Dittami, S.M., Scornet, D., Petit, J., Corre, E., Dondrup, M., Glatting K-H., Köning, R., Sterck, L., Rouzé, P., Van de Peer, Y., Cock, J.M., Boyen, C. y 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 Biol.* Vol. 10 (R66).

Dittami, S.M., Gravot, A., Renault, D., Goulitquer, S., Eggert, A., Bouchereau, A., Boyen, C. y Tonon, T. 2011. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant Cell Environ.* Vol. 34: 629-642.

Dittami, S.M., Gravot, A., Goulitquer, S., Rousvoal, S., Peters, A.F., Bouchereau, A., Boyen, C. y Tonon, T. 2012. Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in *Ectocarpus* (brown algae). *Plant J.* Vol. 71: 366-377.

Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M. y Kazan, K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Vol. 19: 2225-2245.

Doran, E. y Cattolico, R. A. 1997. Photoregulation of chloroplast gene transcription in the chromophytic alga *Heferosigma carferae*. *Plant Physiol.* Vol. 115: 773-781.

Dörnemann, D., Navakoudis, E. y Kotzabasis, K. 1996. Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wild type and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their role in chloroplast photodevelopment. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* Vol. 36: 293-299.

Dring, M.J. 1988. Photocontrol of development in algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 39: 157-174.

Du, H., Yang, S-S., Liang, Z., Feng, B-R., Liu, L., Huang, Y-B. y Tang, Y-X. 2012. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. *BMC Plant Biol.* Vol. 12: 106.

El-Assal, S.E., Alonso-Blanco, C., Hanhart, C.J. y Koornneef, M. 2001. Pleiotropic effects of the *Arabidopsis* *CRYPTOCHROME 2* allelic variation underlie fruit trait-related QTL. *Plant Biol. (Stuttg.)*. Vol. 6(4): 370-374.

Falkowski, P.G. y La Roche, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* Vol. 27: 8-14.

Feirer, R.P., Mignon, G. y Litvay, J.D. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in wild carrot. *Science*. Vol. 223: 1433-1434.

Fernández-Barbero, G. 2015. Represión de la respuesta a Jasmonatos: el complejo JAZ/NIN-JA/TOPLESS. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.

Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M.I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G. y Solano, R. 2011. The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell*. Vol. 23: 701-715.

Figuroa, P. y Browse, J. 2015. Male sterility in Arabidopsis induced by overexpression of a MYC5-SRDX chimeric repressor. *Plant J*. Vol. 6: 849-60.

Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L. y Rock, C.D. 2002. Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. *Plant Cell*. S15-S45.

Fornara, F., Panigrahi, K.C., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J.A. y Coupland, G. 2009. Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev. Cell*. Vol. 17(1): 75-86.

Fries, L. 1980. Axenic tissue cultures from the sporophytes of *Laminaria digitata* and *Laminaria hyperborea* (Phaeophyta). *J. Phycol.* Vol. 16: 473-477.

Fu, W., Guðmundsson, O., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésón, O.S., Pálsson, B.Ø. y Brynjólfsson, S. 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 97(6): 2395-2403.

Fu, X., Wang, D., Yin, X., Du P. y Kan, B. 2014. Time course transcriptome changes in *Shewanella* algae in response to salt stress. *PLOS ONE*. Vol. 9(5): e96001.

Fukuzawa, M. 2011. Control of prestalk-cell differentiation by transcription factors. *Develop. Growth Differ.* Vol. 53: 538-547.

Ganapathi, M., Srivastava, P., Das Sutar, S.K., Kumar, K., Dasgupta, D., Pal Singh, G., Brahmachari, V. y Brahmachari, S.K. 2005. Comparative analysis of chromatin landscape in regulatory regions of human housekeeping and tissue specific genes. *BMC Bioinformatics*. Vol. 6: 126.

Ganesan, M., Veeragurunathan, V., Eswaran, K., Reddy, C.R.K. y Jha, B. 2010. Influence of ultraviolet radiation on spore liberation in marine macroalgae *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyceae) and *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyceae). *Phycol. Res.* Vol. 58: 293-297.

García-Jiménez, P. 1994. Aclimatación reproductiva fisiológica y estructural al cultivo *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.

García-Jiménez, P., Rodrigo, M. y Robaina, R.R. 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *J. App. Phycol.* Vol. 10(1): 95-100.

García-Jiménez, P., Just, P.M., Delgado, A.M. y Robaina, R.R. 2007. Transglutaminase activity decrease during acclimation to hyposaline conditions in marine seaweed *Grateloupia doryphora* (Rhodophyta, Halymeniaceae). *J. Plant Physiol.* Vol. 164(3): 367-370.

García-Jiménez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C. y Robaina, R.R. 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). *J. Plant Physiol.* Vol. 166: 1745-1754.

García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2012. Effects of ethylene on tetrasporogenesis in *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 48(3): 710-715.

García-Jiménez, P., Brito-Romano, O. y Robaina, R.R. 2013. Production of volatiles by the red seaweed *Gelidium arbuscula* (Rhodophyta): emission of ethylene and dimethylsulfide. *J. Phycol.* Vol. 49: 661-669.

García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2015. On reproduction in red algae: further research needed at the molecular level. *Front. Plant Sci.* Vol. 6: 93.

García-Jiménez, P., Brito-Romano, O. y Robaina, R.R. 2016. Occurrence of jasmonates during cystocarp development in the red alga *Grateloupia imbricata*. *J. Phycol.* Vol. 52(6): 1085-1093.

García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2017. Volatiles in the aquatic marine ecosystem: ethylene and related plant hormones and sporulation in red seaweeds. En *Systems Biology of Marine Ecosystems*. Ed: Kumar, M. Springer. *En prensa*.

Gerken, A.R., Eller, O.C., Hahn, D.A. y Morgan, T.J. 2015. Constraints, independence, and evolution of thermal plasticity: Probing genetic architecture of long- and short-term thermal acclimation. *PNAS.* Vol. 7(14): 4399-4404.

Gazzarrini, S. y McCourt, P. 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 4(5): 387-391.

Gill, S.S. y Tuteja, N. 2010. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.* Vol. 5(1): 26-33.

Giraud, E., Van Aken, O., Ho, L.H.M. y Whelan, J. 2009. The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of *ALTERNATIVE OXIDASE1*. *Plant Physiol.* Vol. 150: 1286-1296.

Godínez-Ortega, J.L., Snoeijs, P., Robledo, D., Freile-Pelegrín, Y. y Pedersén, M. 2007. Growth and pigment composition in the red alga *Halymenia floresii* cultured under different light qualities. *J. Appl. Phycol.* Vol. 20(3): 253-260.



- Gómez-Gómez, L., Trapero-Mozos, A., Gómez, M.D., Rubio-Moraga, A. y Ahrazem, O. 2012. Identification and possible role of a MYB transcription factor from saffron (*Crocus sativus*). J. Plant. Physiol. Vol. 169: 509-515.
- González, D.H. 2016. Plant transcription factors: evolutionary, structural and functional aspects. Ed: González, D.H. Elsevier.
- Gramzow, L. y Theissen, G. 2010. A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. Genome Biol. Vol. 11: 214.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L. y Kater, M.M. 2008. AGAMOUS-LIKE24 and SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in Arabidopsis. Plant J. Vol. 56: 891-902.
- Gregis, V., Sessa, A., Dorca-Fornell, C. y Kater, M. M. 2009. The Arabidopsis floral meristem identity genes *AP1*, *AGL24* and *SVP* directly repress class B and C floral homeotic genes. Plant J. Vol. 60(4): 626-637.
- Gubler, F., Raventos, D., Keys, M., Watts, R., Mundy, J. y Jacobsen, J.V. 1999. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. Plant J. Vol. 17(1): 1-9.
- Guiry, M.D. y Cunningham, E. M. 1984. Photoperiodic and temperature responses in the reproduction of north-eastern Atlantic *Gigartina acicularis* (Rhodophyta: Gigartinales). Phycologia. Vol. 23: 357-367.
- Guedes-Corrêa, L.G., Riaño-Pachón, D.M., Guerra Schrago, C., Vicentini dos Santos, R., Mueller-Roeber, B. y Vincentz, M. 2008. The Role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. PLOS ONE. Vol. 3(8): e2944.
- Guzmán-Urióstegui, A., Robledo, D. y Robaina, R.R. 2002. Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta). J. Phycol. Vol. 38: 1169-1175.
- Hamana, K., Miyagawa, K. y Matsuzaki, S. 1983. Occurrence of sym-homospermidine as the mayor polyamine in nitrogen-fixing cyanobacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 112: 606-613.
- Hamana, K., Matsuzaki, S., Niitsu, M., Samejima, K. y Nagashima, H. 1990. Polyamines of unicellular thermoacidophilic red alga *Cyanidium caldarium*. Photochemistry. Vol. 29: 377-380.
- Hao, X., Shi, M., Cui, L., Xu, C., Zhang, Y. y Kai, G. 2015. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 62(1): 24-31.
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X-J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H. y Ashikari, M. 2009. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. Nature. Vol. 460: 1026-1030.

- Hayashi, S., Murakami, Y. y Matsufuji, S. 1996. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem. Sci.* Vol. 21: 27-30.
- Heimer, Y.M. y Mizrahi, Y. 1982. Characterization of ornithine decarboxylase of tobacco cells and tomato ovaries. *Biochem. J.* Vol. 201: 373-376.
- Hu, J., Wang, D., Li, J., Jing, G., Ning, K. y Xu, J. 2014. Genome-wide identification of transcription factors and transcription-factor binding sites in oleaginous microalgae *Nannochloropsis*. *Sci. Rep.* Vol. 4(5454).
- Huang, H., Tudor, M., Weiss, C.A., Hu, Y. y Ma, H. 1995. The Arabidopsis MADS-box gene AGL3 is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol. Biol.* Vol. 28(3): 549-567.
- Hubé, F., Reverdiau, P., Lochmann, S. y Gruel, Y. 2005. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol. Biotechnol.* Vol. 31(1): 81-84.
- Huq, E. y Quail, P.H. 2002. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *EMBO J.* Vol. 21(10): 2441-2450.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K. y Quail, P.H. 2004. Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH: Regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science.* Vol. 305(5692): 1937-1941.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, V., Tiedemann, J., Kroj, T. y Parcy, F. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* Vol. 7(3): 106-111.
- Jensen, M.A., Fukushima, M. y Davis, R.W. 2010. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in *de novo* synthesis. *PLOS ONE.* Vol. 5(6): e11024.
- Jones, A.M.P., Saxena, P.K. y Murch, S.J. 2009. Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* L. by gibberellic acid and triazoles. *Eng. Life Sci.* Vol. 9(3): 205-210.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y., Theisen, J.W. y Kadonaga, J.T. 2008. The RNA polymerase II core promoter -the gateway to transcription. *Curr. Opin. Cell. Biol.* Vol. 20: 253-259.
- Kagale, S., Links, M.G. y Rozwadowski, K. 2010. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol.* Vol. 152: 1109-1134.
- Kakkar, R.K. y Rai, V.K. 1993. Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *Phytochem.* Vol. 33:1281-1288.
- Kamiya, M., Kawai, H., Moon, D. y Goff, A.L.J. 2011. Isolation and characterization of phase-specific cDNAs from carposporophytes of *Gracilariopsis andersonii* (Gracilariales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* Vol. 46(1): 27-35.

- Kang, H., Oh, E., Choi, G. y Lee, D. 2010. Genome-wide DNA-binding specificity of PIL5, an Arabidopsis basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor. *Int. J. Data Min. Bioin.* Vol. 4(5): 588-599.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A., Altabella, T., Galston, A. 2003. Polyamines in plants: an overview. *J. Cell Mol. Biol.* Vol. 2: 1-12.
- Klug, W.S. y Cummings, M.R. 1999. *Conceptos de genética*. Prentice Hall. Madrid.
- Knight, H., Zarka, D.G., Okamoto, H., Thomashow, M.F. y Knight, M.R. 2004. Abscisic acid induces *cbf* gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiol.* Vol. 135: 1710-1717.
- Kolodrubetz, D. 1990. Consensus sequence for HMG1-like DNA Binding domains. *Nucleic Acids Res.* Vol. 18(18): 5565.
- Kujur, A., Upadhyaya, H.D., Bajaj, D., Gowda, C.L.L., Sharma, S., Tyagi, A.K. y Parida, S.K. 2016. Identification of candidate genes and natural allelic variants for QTLs governing plant height in chickpea. *Sci. Rep.* Vol. 6: 27968.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 33: 1870-1874.
- Kwak, K.J., Kim, J.Y., Kim, Y.O. y Kang, H. 2007. Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing high mobility group B proteins under high salinity, drought or cold stress. *Plant Cell Physiol.* Vol. 48: 221-231.
- Lai, B., Hu, B., Qin, Y-H., Zhao, J-T., Wang, H-C. y Hu, G-B. 2015. Transcriptomic analysis of *Litchi chinensis* pericarp during maturation with a focus on chlorophyll degradation and flavonoid biosynthesis. *BMC Genomics.* Vol. 16: 225.
- Lang, D., Weiche, B., Timmerhaus, G., Richardt, S., Riaño-Pachón, D.M., Corrêa, L.G., Reski, R., Mueller-Roeber, B. y Rensing, S.A. 2010. Genome-wide phylogenetic comparative analysis of plant transcriptional regulation: a timeline of loss, gain, expansion, and correlation with complexity. *Genome Biol.* Vol. 2: 488-503.
- Launholt, D., Merkle, T., Houben, A., Schulz, A. y Grasser, K.D. 2006. Arabidopsis chromatin-associated HMGA and HMGB use different nuclear targeting signals and display highly dynamic localization within the nucleus. *Plant Cell.* Vol.18: 2904-2918.
- Le Bail, A., Billoud, B., Le Panse, S., Chenivresse, S. y Charrier, B. 2011. ETOILE regulates developmental patterning in the filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant Cell.* Vol. 23: 1666-1678.
- Lee, Y. K., Kim, S.H., Hong, C.B., Chah, O-K., Kim, G.H. y Lee, I.K. 1998. Heat-shock protein 90 may be involved in differentiation of the female gametophytes in *Griffithsia japonica* (Ceramiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 34: 1017-1023.

- Lee, T.M. y Chen, M.H. 1998. Hyposaline effect on polyamine accumulation in *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta). Bot. Bull. Acad. Sin. Vol. 39: 167-174.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R. y Quail, P.H. 2008. The Arabidopsis Phytochrome-Interacting Factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. Plant Cell. Vol. 20: 337-352.
- Leon, P. y Sheen, J. 2003. Sugar and hormone connections. Trends Plant Sci. Vol. 8: 110-116.
- Li, L-C., Hsu, Y-T., Chang, H-L., Wu, T-M., Sung, M-S., Cho, C-L. y Lee, T-S. 2013. Polyamine effects on protein disulfide isomerase expression and implications for hypersalinity stress in the marine alga *Ulva lactuca* Linnaeus. J. Phycol. Vol. 49(6): 1181-1191.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M. y Perata, P. 2013. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. New Phytol. Vol. 199: 639-649.
- Lijavetzky, D., Carbonero, P. y Vicente-Carbajosa, J. 2003. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. BMC Evol. Biol. Vol. 3:17.
- Liu, Q.Y. y Reith, M.E. 1994. Isolation of a gametophyte-specific cDNA encoding a lipoxygenase from the red alga *Porphyra purpurea*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. Vol. 3: 206-209.
- Liu, Q.Y., Baldauf, S.L. y Reith, M.E. 1996a. Elongation factor 1 alpha genes of the red alga *Porphyra purpurea* include a novel, developmentally specialized variant. Plant Mol. Biol. Vol. 31: 77-85.
- Liu, Q.Y., Ross, N., Lanthier P. y Reith, M.E. 1996b. A gametophyte cell wall protein of the red alga *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) contains four apparent polysaccharide-binding domains. J. Phycol. Vol. 32: 995-1003.
- Liu, Q.Y., van der Meer, J.P. y Reith, M.E. 1996c. A sporophyte cell wall protein of the red alga *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) is a novel member of the chymotrypsin family of serine proteases. J. Phycol. Vol. 32: 1003-1009.
- Liu, E., Liu, Y., Wu, G., Zeng, S., Tran Thi, T.G., Liang, L., Liang, Y., Dong, Z., She, D., Wang, H., Zaid, I.U. y Hong, D. 2016. Identification of a candidate gene for panicle length in rice (*Oryza sativa* L.) via association and linkage analysis. Front. Plant Sci. Vol. 7: 596.
- Loewen, P.C. y Switala, J. 1995. Template secondary structure can increase the error frequency of the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. Gene. Vol. 164(1): 59-63.
- López Contreras, A.J. 2008. Caracterización de ODCp como una nueva proteína inhibidora de antizimas (AZIN2). Aspectos estructurales y funcionales. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Murcia. España.

- López-Figueroa, F. y Niell, F.X. 1989. Red light and blue light regulation photoreceptors controlling chlorophyll *a* synthesis in the red alga *Porphyra umbilicalis* and in the green alga *Ulva rigida*. *Physiol. Plant.* Vol. 76: 391-397.
- López-Figueroa, F. y Niell, F. X. 1990. Effects of light quality of chlorophyll and biliprotein accumulation on seaweeds. *Mar. Biol.* Vol. 104: 321-327.
- López-Figueroa, L., Lindemann, P., Braslavsky, S.E., Schaffner, K., Schneider-Poetsch, H.A.W. y Rüdiger, R. 1989. Detection of a phytochrome-like photoreceptor in macroalgae. *Bot. Acta.* Vol. 102: 178-180.
- López-Figueroa, F., Lindemann, P., Braslavsky, S.E., Schaffner, K., Schneider-Poetsch, H.A.W. y Rüdiger, W. 1990. Detection of some conserved domains in phytochrome-like proteins from algae. *J. Plant Physiol.* Vol. 136: 484-487.
- Loomis, W. F. 2014. Cell signaling during development of *Dictyostelium*. *Dev Biol.* Vol. 391(1): 1-16.
- Lu, Y., Jiang, P., Liu, S., Gan, Q., Cui, H. y Qin, S. 2010. Methyl jasmonate- or gibberellins A(3)-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of beta-carotene ketolase genes (*bkts*) in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technol.* Vol. 101: 6468-6474.
- Lüning, K. 1992. Day and night kinetics of growth rate in green brown and red seaweeds. *J. Phycol.* Vol. 28: 794-803
- Lüning, K. 1993. Environmental and internal control of seasonal growth in seaweeds. *Hydrobiologia.* Vol. 260(1): 1-14.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P. y Lopez, R. 2013. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* Vol. 41(Web Server issue): W597-600.
- Marcolino-Gomes, J., Rodrigues, F.A., Neves Oliveira, M.C., Bouças Farias, J.R., Neumaier, N., Vilela Abdelnoor, R., Marcelino-Guimarães, F.C. y Lima Nepomuceno, A. 2013. Expression patterns of GmAP2/EREB-like transcription factors involved in soybean responses to water deficit. *PLOS ONE.* Vol. 8(5): e62294.
- Marián, F.D. 2002. Mixotrofia y actividad biosintética de ácidos grasos e interacción poliamidas-glicerol durante el crecimiento y desarrollo de macroalgas marinas *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Mathieu, J., Yant, L.J., Mürdter, F., Küttner, F. y Schmid, M. 2009. Repression of flowering by the miR172 Target SMZ. *PLOS Biol.* Vol. 7(7): e1000148.
- Matsoukas, I.G., Massiah, A.J. y Thomas, B. 2012. Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant Cell Physiol.* Vol. 53(11): 1827-1842.

- Meyer, S., Temme, C. y Wahle, E. 2004. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* Vol. 39: 197-216.
- Michaels, S.D. y Amasino, R.M. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* Vol. 11: 949-956.
- Mitchell, S.F., Walker, S.E., Algire, M.A., Park, E.H., Hinnebusch, A.G. y Lorsch, J.R. 2010. The 5'-7- methylguanosine cap on eukaryotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and to block an alternative pathway. *Mol Cell.* Vol. 39: 950-962.
- Mitsuda, N. y Ohme-Takagi, M. 2009. Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* Vol. 50(7): 1232-1248.
- Mizoi, J., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Acta Biochim. Bioph.* Vol. 1819: 86-96.
- Mofatto, L.S., Carneiro, F.A., Vieira, N.G., Duarte, K.E., Vidal, R.O., Alekcevetch, J.C., Cotta, M.G., Verdeil, J-L., Lapeyre-Montes, F., Lartaud, M., Leroy, T., De Bellis, F., Pot, D., Rodrigues, G.C., Carazzolle, M.F., Pereira, G.A.G., Andrade, A.C. y Marraccini, P. 2016. Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biol.* Vol. 16: 94.
- Molina, C. y Grotewold, E. 2005. Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoter. *BMC Genomics.* Vol. 6(25).
- Montague, M.J., Koppenbrink, J.W. y Jaworski, E.G. 1979. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. *Plant Physiol.* Vol. 62: 430-433.
- Montero-Fernández, M., Robaina, R.R. y García-Jiménez, P. 2016. *In silico* characterization of DNA motifs associated with the differential expression of the ornithine decarboxylase gene during *in vitro* cystocarp development in the red seaweed *Grateloupia imbricata*. *J. Plant Physiol.* Vol. 195: 31-38.
- Montes Resano, M. 2012. Mecanismo molecular del acoplamiento de la transcripción y el *splicing* alternativo de los pre-mRNAs por TCERG1. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- Moreno, J.E., Shyu, C., Campos, M.L., Patel, L.C., Chung, H.S., Yao, J., He, S.Y. y Howe, G.A. 2013. Negative feedback control of jasmonate signaling by an alternative splice variant of JAZ10. *Plant Physiol.* Vol. 162: 1006-1017.
- Moreno-Risueno, M.A., Martínez, M. Vicente-Carbajosa, J. y Carbonero, P. 2007. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Mol. Genet. Genomics.* Vol. 277(4): 379-390.
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M-F., Vadstein, O. y Bohnes, A.M. 2013. Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network,

bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Mar. Drugs*. Vol. 11(11): 4662-4697.

Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R. y Ceccherini, I. 2006. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J. Mol. Diagn.* Vol. 8(5): 544-550.

Nakamura, Y., Sasaki, N., Kobayashi, M., Ojima, N., Yasuike, M., Shigenobu, Y., Satomi, M., Fukuma, Y., Shiwaku, K., Tsujimoto, A., Kobayashi, T., Nakayama, I., Ito, F., Nakajima, K., Sano, M., Wada, T., Kuhara, S., Inouye, K., Gojobori, T. y Ikeo, K. 2013. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, *Susabi-nori* (*Pyropia yezoensis*). *PLOS ONE*. Vol. 8: e57122.

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. y Hideaki, S. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* Vol. 140: 411-432.

Ni, M., Tepperman, J.M. y Quail, P.H. 1998. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*. Vol. 95(5): 657-667.

Niessing, D., Blanke, S. y Jäckle, H. 2002. Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev.* Vol. 16(19): 2576-2582.

Niu, X., Helentjaris, T. y Bate, N.J. 2002. Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *Plant Cell*. Vol. 14(10): 2565-2575.

Niu, Y., Figueroa, P. y Browse, J. 2011. Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* Vol. 1:12.

Noguero, M., Muhammad Atif, R., Ochatt, S. y Thompson, R.D. 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Sci.* Vol. 209: 32-45.

Novikova, G.V., Moshkov, I.E., Smith, A.R. y Hall, M.A. 2000. The effect of ethylene on MAPK-kinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* Vol. 474: 29-32.

Ochman, H., Gerber, A.S. y Hartl, D.L. 1988. Genetic application of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*. Vol. 120: 621- 623.

Palma, K., Zhao, Q., Cheng, Y.T., Bi, D., Monaghan, J., Cheng, W., Zhang, Y. y Li, X. 2007. Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms. *Genes Dev.* Vol. 21: 1484-1493.

Parenicová, L., de Folter, S., Kieffer, Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. y Colombo, L. 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell*. Vol. 15: 1538-1551.

Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., Inze, D., y Goossens, A. 2008. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 105: 1380-1385.

Pauwels, L., Inze, D., y Goossens, A. 2009. Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci*. Vol. 14: 87-91.

Pegg, A.E. 2006. Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem*. Vol. 281(21): 14529-14532.

Pérez-Amador, M.A., Carbonell, J. y Granell, A. 1995. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Mol Biol*. Vol. 28(6): 997-1009.

Pérez-Rodríguez, P., Riaño-Pachón, D.M., Guedes-Corrêa, L.G., Rensing, S.A., Kersten, B. y Mueller-Roeber, B. 2010. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res*. Vol. 38(Database issue): D822-D827.

Pflieger, S., Lefebvre, V. y Causse, M. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Mol. Breeding*. Vol. 7(4): 275-291.

Phukan, U.J., Jeena, G.S., Tripathi, V. y Shukla, R.K. 2017. Regulation of *Apetala2*/Ethylene response factors in plants. *Front. Plant Sci*. Vol. 8(150).

Pohl, R. 1948. Tagesrhythmus in phototakischen Verhalten der *Euglena gracilis*. *Z Naturforsch*. Vol. 3b: 367-374.

Polne-Fuller, M. y Gibor, A. 1984. Developmental studies in *Porphyra*. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *J. Phycol*. Vol. 20: 609-616.

Polne-Fuller, M., Biniaminov, M. y Gibor, A. 1984. Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. *Hydrobiologia*. Vol. 116(7): 308-313.

Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., Gleba, D., Jenkins, I.S., Halpern, B.T., Kneer, R., Cragg, G.M. y Raskin, I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem*. Vol. 46: 2542-2547.

Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. y Coupland, G. 1995. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*. Vol. 80: 847-857.

Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., y Xie, D. 2011. The Jasmonate-ZIM-Domain Proteins interact with the wd-repeat/bhlh/myb complexes to



- regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. Vol. 23(5): 1798-1814.
- Qiao, Q., Huang, Y., Qi, J., Qu, M., Jiang, C., Lin, P., Li, R., Song, L., Yonezawa, T., Hasegawa, M., Crabbe, M.J.C., Chen, F., Zhang, T. y Zhong, Y. 2016. The genome and transcriptome of *Trichormus* sp. NMC-1: insights into adaptation to extreme environments on the Qinghai-Tibet Plateau. *Sci. Rep.* Vol. 6: 29404.
- Rao, G., Sui, J., Zeng, Y., He, C. y Zhang, J. 2015. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Salix arbutifolia*. *FEBS Open. Bio.* Vol. 5: 132-137.
- Raz, V. y Fluhr, R. 1993. Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell*. Vol. 5: 523-530.
- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I., y Reinbothe, S. 2009. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J.* Vol. 276: 4666-4681.
- Ren, X., Zhang, X. y Sui, Z. 2006. Identification of phase relative genes in tetrasporophytes and female gametophytes of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Electron. J. Biotech.* Vol. 9(2).
- Ren, X., Sui, Z., Mao, Y., Zang, X., Xu, D. y Zhang, X. 2009. Cloning and characterization of two types of ubiquitin genes from *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* Vol. 21: 273-278.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M., Krishnamurthy, V., Dicke, M. y Farmer, E.E. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell*. Vol. 16: 3132-3147.
- Riaño-Pachón, D.M., Corrêa, L.G.G., Trejos-Espinosa, R. y Mueller-Roeber, B. 2008. Green transcription factors: a *Chlamydomonas* overview. *Genetics*. Vol. 179: 31-39.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samah, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghyevari, D., Sherman, B.K. y Yu, G. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. Vol. 290: 2105-2110.
- Riechmann, J.L. 2002. Transcriptional regulation: a genomic overview. En *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. pp: 2-46. California.
- Rice, P., Longden, I. y Bleasby, A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. Vol. 16(6): 276-277.
- Ritter, A., Ubertini, M., Romac, S., Gaillard, F., Delage, L., Mann, A., Cock, J.M., Correa, J.A. y Potin, P. 2010. Copper stress proteomics highlights local adaptation of two strains of the model brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Proteomics*. Vol. 10: 1-15.

- Ritter, A., Dittami, S. M., Goulitquer, S., Corrêa, J.A., Boyen, C., Potin, P. y Tonon, T. 2014. Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol.* Vol. 14: 116.
- Robaina, R.R. 1988. Biotecnología del cultivo *in vitro* de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Robaina, R.R., Reina, G. y Luque, A. 1990. The effects of the physical characteristics of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue culture. *Hydrobiologia.* Vol. 204(1): 137-142.
- Rodrigo, M. 1998. Desarrollo en macroalgas: sustancias reguladoras, fotofisiología y diferenciación celular (tetrasporogénesis) durante los estadios de crecimiento *in vitro* del alga roja *Grateloupia doryphora*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Rueda-López, M., Crespillo, R., Cánovas, F.M. y Avila, C. 2008. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. *Plant J.* Vol. 56(1): 73-85.
- Rüdiger, W. y López-Figueroa, F. 1992. Photoreceptors in algae. *Photochem. Photobiol.* Vol. 55: 949-954.
- Sacramento, A.T., García-Jiménez, P., Alcázar, R., Tiburcio, A.F. y Robaina, R.R. 2004. Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 40: 887-894.
- Sacramento, A.T., García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2007. Spermine induces cystocarp development in marine alga. *Plant Growth Regul.* Vol. 53: 147-154.
- Saga, N., Motomura, T. y Sakai, Y. 1982. Induction of callus from the marine brown alga *Dictyosiphon foeniculaceus*. *Plant Cell Physiol.* Vol. 23: 727-730.
- Saga, N. y Sakai, Y. 1983. Axenic tissue culture and callus formation of the marine brown alga *Laminaria anquastata*. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* Vol. 49: 1561-1563.
- Saha, G., Park, J-I., Jung, H-J., Ahmed, N.U., Kayum, M.A., Chung, M-Y., Hur, Y., Cho, Y-G., Watanabe, M. y Nou, I-S. 2015. Genome-wide identification and characterization of MADS-box family genes related to organ development and stress resistance in *Brassica rapa*. *BMC Genomics.* Vol. 16: 178.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 290: 998-1009.

- Saleh, A. y Pagés, M. 2003. Plant AP2/ERF transcription factors. *Genetika*, Vol. 35(1): 37-50.
- Schweizer, F., Fernández-Calvo, P., Zyer, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., Lewsey, M.G., Ecker, J.R., Solano, R. y Reymond, P. 2013. Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell*. Vol. 8: 3117-3132.
- Searle, I. y Coupland, G. 2004. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBOSS J*. Vol. 23: 1217-1222.
- Sgamma, T., Jackson, A., Muleo, R., Thomas, B. y Massiah, A. 2014. TEMPRANILLO is a regulator of juvenility in plants. *Sci. Rep*. Vol. 4: 3704.
- Sharoni, A.M., Nuruzzaman, M., Satoh, K., Shimizu, T., Kondoh, H., Sasaya, T., Choi, I-R., Omura, T. y Kikuchi, S. 2011. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol*. Vol. 52(2): 344-360.
- Shore, P. y Sharrocks, A.D. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem*. Vol. 229: 1-13.
- Silver, J. y Keerikatte, V. 1989. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J. Virol*. Vol. 63(5): 1924-1928.
- Sivanandhan, G., Kapil Dev, G., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arjunan, A., Muthuselvam, M., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. y Ganapathi, A. 2013. Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin A in hairy root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. Vol. 114: 121-129.
- Slocum, R.D. y Galston, A.W. 1985. Changes in polyamine biosynthesis associated with post-fertilization growth and development in tobacco ovary tissue. *Plant Physiol*. Vol. 79: 336-343.
- Soule, K.M. 2007. Light-regulated photosynthetic gene expression and enzyme activity in the Heterokont alga *Vaucheria litorea* and its symbiotic partner the Sacoglossan mollusc *Elysia chlorotica*. Tesis Doctoral. Universidad de Maine. Maine. Estados Unidos.
- Souza de Oliveira, L., Tschoeke, D.A., Santos de Oliveira, A., Hill, L.J., Paradas, W.C., Salgado, L.T., Thompson, C.C., Pereira, R.C. y Thompson, F.L. 2015. New insights on the terpenome of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta). *Mar. Drugs*. Vol. 13(2): 879-902.
- Sridhar, V.V., Surendrarao, A. y Liu, Z. 2006. APETALA1 and SEPALLA-TA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development*. Vol. 133: 3159-3166.

- Stemmer, C., Ritt, C., Igloi, G. L., Grimm, R. y Grasser, K.D. 1997. Variability in *Arabidopsis thaliana* chromosomal high-mobility-group-1-like proteins. *Eur. J. Biochem.* Vol. 250: 646-652.
- Stiller, J.W. y Perry, J. 2012. Major developmental regulators and their expression in two closely related species of *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 48: 883-896.
- Suzuki, L. y Johnson, C.H. 2001. Algae know the time of day: circadian and photoperiodic programs. *J. Phycol.* Vol. 37: 933-942.
- Sweeney, B.M. y Hastings, J.W. 1957. Characteristics of the diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *J. Cell. Physiol.* Vol. 49(1): 115-128.
- Talarski, A., Manning, S.R. y La Claire, J.W. 2016. Transcriptome analysis of the euryhaline alga, *Prymnesium parvum* (Prymnesiophyceae): effects of salinity on differential gene expression. *Phycologia.* Vol. 55(1): 33-44.
- Tanabe, Y., Hasebe, M., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Kitani, M., Henschel, K., Münster, T., Theissen, G., Nozaki, H. y Ito, M. 2005. Characterization of MADS-box genes in charophycean green algae and its implication for the evolution of MADS-box genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 102(7): 2436-2441.
- Tandeau de Marsac, N. 1983. Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation in Cyanobacteria. *Bull. Inst. Pasteur.* Vol. 81: 201-254.
- Tarakhovskaya, E.R., Maslov, Y.I. y Shishova, M.F. 2006. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physiol.* Vol. 54(2): 163-170.
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X. y Quail, P.H. 2001. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 98: 9437-9442.
- Thamilarasan, S.K., Park, J.-I., Jung, H.-J. y Nou, I.-S. 2014. Genome-wide analysis of the distribution of AP2/ERF transcription factors reveals duplication and *CBFs* genes elucidate their potential function in *Brassica oleracea*. *BMC Genomics.* Vol. 15: 422.
- Thompson, T., Huang, K., Saito, M.A. y Chisholm, S.W. 2011. Transcriptome response of high- and low-light-adapted *Prochlorococcus* strains to changing iron availability. *ISME J.* Vol. 5: 1580-1594.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. y Quail, P. H. 2003. The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix transcription factor family. *Plant Cell.* Vol. 15: 1749-1770.
- Tonon, T., Eveillard, D., Prigent, S., Bourdon, J., Potin, P., Boyen, C. y Siegel, A. 2011. Toward systems biology in brown algae to explore acclimation and adaptation to the shore environment. *OMICS.* Vol. 15(11): 883-892.
- Tomás-Barberán, F.A., Loiza-Velarde, J., Bonfanti, A. y Saltveit, M.E. 1997. Early wound- and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* Vol. 122: 399-404.

- Triglia, T., Peterson, M.G. y Kemp, D.J. 1988. A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* Vol. 16(16).
- Troy, C.S., MacHugh, D.E., Bailey, J.F., Magee, D.A., Loftus, R.T., Cunningham, P., Chamberlain, A.T., Sykes, B.C. y Bradley, D.G. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature.* Vol. 410: 1091.
- Tsekos, I., Niell, F.X., Aguilera, J., López-Figueroa, F. y Delivopoulos, S.G. 2002. Ultrastructure of the vegetative gametophytic cells of *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta) grown in red, blue and green light. *Phycol. Res.* Vol. 50: 251-264.
- Uji, T., Hirata, R., Mikami, K., Mizuta, H. y Saga, N. 2012. Molecular characterization and expression analysis of sodium pump genes in the marine red alga *Porphyra yezoensis*. *Mol. Biol. Rep.* Vol. 39: 7973-7980.
- Uji, T., Mizuta, H. y Saga, N. 2013. Characterization of the sporophyte- preferential gene promoter from the red alga *Porphyra yezoensis* using transient gene expression. *Mar. Biotechnol.* Vol. 15: 188-196.
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. 2004. Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 313(2): 369-375.
- Van Zhong, G. y Burns, J.K. 2003. Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant Mol. Biol.* Vol. 53: 117-131.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real- time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* Vol. 3: 1-12.
- Vandesompele, J., Kubista, M. y Pfaffl, M.W. 2009. En *Reference gene validation software for improved normalization in real-time PCR: current technology and applications*. Eds: Logan, J., Edwards, K. y Saunders, N. Caister Academic Press. pp: 47-64. Londres.
- Velez, P., Alejandri-Ramírez, N-D., González, M.C., Estrada, K.J., Sanchez-Flores, A. y Dinkova, T.D. 2015 Comparative transcriptome analysis of the cosmopolitan marine fungus *Corollospora maritima* under two physiological conditions. *G3 (Bethesda)*. Vol. 5(9): 1805-1184.
- Vieler, A., Wu, G., Tsai, C-H., Bullard, B., Cornish, A.J., Harvey, C., Reza, I-B., Thornburg, C., Achawanantakun, R., Buehl, C.J., Campbell, M.S., Cavalier, D., Childs, K.L., Clark, T.J., Deshpande, R., Erickson, E., Ferguson, A. A., Handee, W., Kong, Q., Li, X., Liu, B., Lundback, S., Peng, C., Roston, R. L., Sanjaya, Simpson, J.P., TerBush, A., Warakanont, J., Zäuner, S., Farre, E.M., Hegg, E.L., Jiang, N., Kuo, M-H., Lu, Y., Niyogi, K.K., Ohlrogge, J., Osteryoung, K.W., Shachar-Hill, Y., Sears, B.B., Sun, Y., Takahashi, H., Yandell, M., Shiu, S-H. y Benning, C. 2012. Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLOS Genet.* Vol. 8(11): e1003064.

- Villanueva, V.R., Adlakha, R.C. y Calvayrac, R. 1980. Biosynthesis of polyamines in *Euglena gracilis*. *Phytochemistry*. Vol. 19: 787-790.
- Von der Heyde, F., Wilkens, A. y Rensing, L. 1992. The effects of temperature on the circadian rhythms of are flashing the two and glow in *Gonyaulax polyedra*: rhythms controlled by two oscillators? *J. Biol. Rhythm*. Vol. 7(2): 115-123.
- Walden, R., Cordeiro, A. y Tiburcio, A.F. 1997. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol*. Vol. 113: 1009-1013.
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. 2005. Empalme del ARN. En *Biología molecular del gen*. Ed: Panamericana. pp: 407-439. Madrid.
- Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R.C., Laue, E.D. y Thomas, J.O. 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J*. Vol. 12(4): 1311-1319.
- Werner, J.D., Borevitz, J.O., Uhlenhaut, N.H., Ecker, J.R., Chory, J. y Weigel, D. 2005. *FRIGIDA*-independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *Genetics*. Vol. 170(3): 1197-1207.
- Whitehead, A. 2012. Comparative genomics in ecological physiology: toward a more nuanced understanding of acclimation and adaptation. *J. Exp. Biol*. Vol. 215: 884-891.
- Wiencke, C., Gómez, I., Pakker, H., Flores-Moya, A., Altamariano, M., Hanelt, D., Bischof, K. y López-Figueroa, F. 2000. Impact of UV radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: Implication for depth zonation. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. Vol. 197: 217-229.
- Woo, H.R., Kim, J.H., Kim, J., Kim, J., Lee, U., Song, I-J., Kim, J-H., Lee, H-Y., Nam, H.G. y Lim, P.O. 2010. The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot*. Vol. 61(14): 3947-3957.
- Xie, K., Wu, C. y Xiong, L. 2006. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol*. Vol. 142(1): 280-293.
- Xu, A., Zhan, J.C. y Huang, W.D. 2015. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. Vol. 122: 197-211.
- Yanagisawa, S. 2000. Dof1 y Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J*. Vol. 21: 281-288.
- Yanagisawa, S. 2004. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol*. Vol. 45(4): 386-391.

- Yanagisawa, S. y Sheen, J. 1998. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell*. Vol. 10: 75-89.
- Yang, M.Y. y Kim, M.S. 2015. Taxonomy of Grateloupia (Halymeniales, Rhodophyta) by DNA barcode marker analysis and a description of *Pachymeniopsis volvita* sp. nov. *J. Appl. Phycol.* Vol. 27(3): 1373-1384.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J. y Okada, K. 2009. Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development*. Vol. 136: 1039-1048
- Yue, C.-J. y Jiang, Y. 2009. Impact of methyl jasmonate on squalene biosynthesis in microalga *Schizochytrium mangrovei*. *Process Biochem.* Vol. 44(8): 923-927.
- Zhang, Y. y Turner, J.G. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLOS ONE*. Vol. 3(11): e3699.
- Zhang, H., Jin, J., Tang, L., Zhao, Y., Gu, X., Gao, G. y Luo, J. 2011. PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* Vol. 39 (Database issue): D1114-D1117.
- Zhang, H.-M., Chen, H., Liu, W., Liu, H., Gong, J., Wang, H. y Guo, A.-Y. 2012. Animal TFDB: a comprehensive animal transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* Vol. 40: D144-D149.
- Zhao, M., Morohashi, K., Hatlestad, G., Grotewold, E. y Lloyd, A. 2008. The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development*. Vol. 135(11): 1991-1999.
- Zhuang, J., Sun, C.-C., Zhou, X.-R., Xiong, A.-S. y Zhang, J. 2011. Isolation and characterization of an AP2/ERF-RAV transcription factor BnaRAV-1-HY15 in *Brassica napus* L. HuYou15. *Mol. Biol. Rep.* Vol. 38: 3921-3928.
- Zou, J.-J., Wei, F.-J., Wang, C., Wu, J.-J., Ratnasekera, D., Liu, W.-L. y Wu, W.-H. 2010. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca<sup>2+</sup>-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol.* Vol. 154: 1232-1243.







# CAPÍTULO II



## Introducción

### Papel de los compuestos volátiles en los organismos autótrofos

Los vegetales presentan la capacidad de sintetizar una increíble variedad de compuestos, metabolitos primarios y secundarios, como respuesta al estado fisiológico, interacciones con factores bióticos y abióticos y/o las necesidades requeridas por el organismo. La naturaleza sésil de estos organismos ha supuesto el desarrollo de vías de adaptación frente a las condiciones variables del medio tales como variaciones de salinidad, deficiencia de nutrientes o sequía. En este sentido, la síntesis y emisión de estas sustancias, entre ellas los compuestos volátiles, inducida por diferentes tipos de estrés supone una respuesta para el mantenimiento de la homeostasis y el correcto funcionamiento fisiológico (Shulaev *et al.*, 2008).

Sin embargo, la naturaleza de estos compuestos es muy variada y a día de hoy el papel de estos metabolitos secundarios, a veces llamados productos naturales, no es del todo clara, ya que no siempre presentan una función energética o estructural sino más bien un propósito ecológico, tanto para establecer relaciones intraespecíficas, interespecíficas o con el ambiente.

De entre todos ellos, los compuestos más estudiados en plantas han sido los terpenos (isoprenos, monoterpenos y sesquiterpenos), seguidos por los derivados de ácidos grasos (hidrocarburos saturados e insaturados), bencenoides y fenilpropanoides, aunque también existen compuestos nitrogenados o azufrados (Knudsen *et al.*, 1993; Dudareva *et al.*, 2004; Owen y Peñuelas, 2005; Marín-Loaida y Céspedes, 2007). Asimismo, diferentes vías biosintéticas han sido identificadas en función de la naturaleza de la sustancia (revisado en Schwab *et al.*, 2008).

El estudio de los mismos ha demostrado su implicación en procesos que afectan diferentes aspectos fisiológicos del vegetal, pudiendo incluso producir cambios a nivel morfológico. Con todo, a día de hoy todavía existen muchos interrogantes sobre el propósito final de estas sustancias, así como sus vías de síntesis y actuación. Al respecto, algunos autores han sugerido que la producción de estos compuestos ocurre sin una finalidad determinada, y que serán los diferentes cambios evolutivos los que determinen su futura utilidad o función (Niinemets *et al.*, 2004; Peñuelas y Llusà, 2004; Rosenstiel *et al.*, 2004).

Actualmente, más de 100.000 compuestos han sido identificados (Spinelli *et al.*, 2011), mostrando que la distribución y papel de estos en los organismos no es generalizado; es decir, por un lado no todos los grupos vegetales presentan los mismos compuestos y por otro, la

función que ejercen es diversa y en gran medida dependiente del organismo, del estado fisiológico y de las diversas interacciones con el medio que le rodea.

Asimismo, su composición y naturaleza varía ampliamente pudiendo ser sintetizados a partir de un sustrato o metabolito primario común y a través de una misma vía biosintética, pero resultando en un producto distinto. De igual manera, un mismo metabolito puede ser producido a partir de diferentes vías.

De entre la amplia gama de productos que se encuentra en la naturaleza, existe un grupo que destaca por su naturaleza volátil, el cual se ha denominado como grupo de los '*Compuestos Orgánicos Volátiles*' (COV o *VOCs* por sus siglas en inglés, *Volatile Organic Compounds*). Se considera COV '*cualquier compuesto orgánico cuya presión de vapor bajo condiciones normales es suficientemente alta para ser vaporizado hacia la atmósfera*' (Dicke y Loreto, 2010). Si bien es cierto que esta denominación se usa en muchas ocasiones indistintamente para nombrar cualquier compuesto volátil sin entrar en más consideraciones, estos COVs pueden a su vez ser clasificados en función de su origen y/o grado de volatilidad. Atendiendo al grado de volatilidad se clasifican en COMV o *VVOC* (Compuestos Orgánicos muy Volátiles: *Very Volatile Organic Compounds*), COSV o *SVOC* (Compuestos Orgánicos Semivolátiles: *Semi-Volatile Organic Compounds*), y el conjunto de todos ellos se conoce como COVT o *TVOC* (Compuestos Orgánicos totales: *Total Volatile Organic Compounds*).

El estudio generalizado de estos compuestos en vegetales ha mostrado su papel en diversos procesos ecológicos tanto de manera directa como indirecta, tales como defensa frente a insectos, reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), adaptación frente a situaciones de estrés o involucrados en las diferentes interacciones que se establecen entre planta-planta, planta-patógeno o entre la planta y el medio ambiente, procesos de desarrollo y reproducción como la polinización.

## **Los compuestos volátiles en plantas**

Inicialmente, los estudios sobre COVs en plantas superiores se enfocaron desde un punto de vista predominantemente ecológico como resultado de la observación de las relaciones que se establecen entre plantas e insectos. Con el paso del tiempo, se vio cómo los procesos fisiológicos vegetales contribuían de manera considerable en la emisión de los mismos a la atmósfera, papel albedo (Lerdau *et al.*, 1997). Se observó además, cómo dicha emisión ocurría de manera diferencial en función del tipo de COV (concentración y propiedades

fisicoquímicas) (Niinemets *et al.*, 2004) así como del organismo. Por ejemplo, algunos vegetales tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de COVs de manera natural, mientras que otros lo hacen de manera posterior a la percepción de un estímulo, lo que se conoce como ICOVs o *IVOCs (Induced VOCs)* (Paré *et al.*, 2005). Los ICOVs parecen ser sintetizados por el vegetal de manera específica y únicamente en aquellos momentos en que son requeridos, lo que no acarrea un constante gasto energético que pudiese afectar negativamente el metabolismo de la planta (Dicke y van Loon, 2000). Asimismo, la liberación o emisión al medio de estas sustancias es dependiente de varios factores bióticos y/o abióticos, y puede ocurrir a partir de un tejido dañado, de manera sistémica en un tejido sano o en el caso de los ICOVs, en un periodo posterior a su síntesis que puede variar desde horas a días (Wiens, 1991; Paré y Tumlinson, 1997; Vuorinen *et al.*, 2004). En este sentido, algunos autores han propuesto que la emisión de los mismos puede ocurrir de manera 'oportunistá' como resultado inherente a su naturaleza volátil (Owen y Peñuelas, 2005). En este sentido y como se ha resaltado, ni todos los COVs se encuentran en todos los vegetales ni el papel que desempeñan es unánime, por lo que se ha propuesto que aunque su función es beneficiosa para el vegetal, no es imprescindible; y por tanto serán las condiciones que afecten su síntesis las que determinen en mayor medida su producción y liberación.

Por otro lado, su capacidad para afectar múltiples procesos fisiológicos en los vegetales ha generado un creciente interés sobre el papel que estas sustancias desempeñan en las diferentes interacciones bióticas. Su estudio, impulsado por el desarrollo de la ecología química, ha permitido la identificación en plantas de una gran variedad de dichos compuestos (Harborne, 1988; Mori, 1999), tales como los terpenos, el etileno (ET), el óxido nítrico (NO) y derivados de los ácidos grasos como el metil jasmonato (MeJa) (en algunos casos conocidos como VHV o *GLV: Green Leaf Volatiles*) entre otros.

Como se ha mencionado previamente, el estudio general de todos ellos ha revelado de manera paralela su implicación en un rango muy variable de procesos ecológicos como la defensa frente a patógenos (insectos o herbivoría) tanto de manera directa como indirecta, así como frente a distintos tipos de estrés biótico y abiótico, aumento en la capacidad de adaptación frente a condiciones ambientales variables, producción de ROS, interacciones entre planta-insecto y planta-planta o como sustancias señalizadoras o feromonas (Knudsen *et al.*, 1993; Apel y Hirt, 2004; Shulaev *et al.*, 2008; Loreto y Schnitzler, 2010; Naznin *et al.*, 2014). Asimismo, se ha comprobado también como afectan de manera directa procesos de desarrollo como el crecimiento de la raíz, crecimiento vegetativo, la tuberización, germinación, desarrollo del polen, la maduración de frutos, regulación del ciclo celular, senescencia, formación de tricomas, producción o maduración de gametos, síntesis de antocianinas y respuesta a

diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Feys *et al.*, 1994; Creelman y Mullet, 1997; Ellis y Turner, 2001; Boughton *et al.*, 2005; Browse, 2005; Wasternack, 2007; Howe y Jander, 2008; Pauwels *et al.*, 2008, 2009; Zhang y Turner, 2008; Reinbothe *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2009; Avanci *et al.*, 2010; Depuydt y Hardtke, 2011; Pauwels y Goossens, 2011; Qi *et al.*, 2011).

De especial importancia es la función defensiva de estas sustancias frente a patógenos y distintos tipos de estrés, la cual constituye una de sus características más ampliamente estudiadas y puede ocurrir tanto de manera individual como en cooperación con otras sustancias reguladoras como el etileno (ET) o el ácido salicílico (SA). Asimismo, esta respuesta defensiva puede ser directa o indirecta. Así, en *Brassica napus* se ha observado como el ácido jasmónico (JA) induce la secreción de néctar floral y extrafloral, los cuales comparten propiedades químicas y funcionales y cuyo papel parece ser atraer a diferentes insectos como las hormigas que ayuden a reducir la presión de herbivoría que sufren estos vegetales (Radhika *et al.*, 2010). En este caso, estaríamos hablando de una respuesta defensiva indirecta. Sin embargo los jasmonatos también controlan la respuesta defensiva de manera directa. Se ha demostrado que la mayoría de las respuestas defensivas vegetales vienen reguladas por derivados del ácido jasmónico (Howe y Jander, 2008; revisado en Yan y Xie, 2015) y por tanto, aquellos vegetales que presenten algún tipo de deficiencia para la síntesis de este tipo de compuestos, tal como ocurre en algunos mutantes de *Nicotiana attenuata*, serán más susceptibles al daño por diferentes organismos herbívoros (Machado *et al.*, 2016). En este sentido es posible diferenciar dos tipos de respuesta en función de la naturaleza del ataque: aquel cuyo origen es biótico (insectos o patógenos) y aquel abiótico (principalmente herida por daño mecánico). Se ha observado que frente al ataque sufrido por insectos tiene lugar un aumento en la producción de los compuestos JA y JA-Ile tanto a nivel local como sistémico, los cuales son requeridos para activar los mecanismos de defensa (Kang *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2008) mientras que cuando la infección es causada por patógenos, específicamente necrotrofos, la respuesta generada no es únicamente dependiente del JA, sino que en este caso generalmente coopera con ET (Xu *et al.*, 1994; Penninckx *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2003; Pre *et al.*, 2008).

No obstante, la capacidad reguladora de los jasmonatos no se ve únicamente delimitada al ámbito de la defensa vegetal, sino que desempeñan un papel destacado en el mantenimiento de las diferentes redes metabólicas implicadas en el normal desarrollo del ciclo de vida de la planta. Así, y de manera paralela a la activación de las vías de defensa correspondientes, actúan en la generación de especies reactivas de oxígeno o ROS. El papel de las ROS en vegetales está ampliamente extendido e implica numerosos factores no del

todo comprendidos. Inicialmente fueron asociados con daño celular, destrucción de proteínas o muerte programada (*PCD*) entre otros (Berlett y Stadtman, 1997; Mittler y Rizhsky, 2000; Lorrain *et al.*, 2003) debido a su naturaleza oxidante. Sin embargo, actualmente se sabe que regulan no sólo procesos relacionados con estrés sino con diferentes aspectos del desarrollo vegetal a través de la interconexión de varias vías o funcionando como moléculas señalizadoras. Por ejemplo, en los procesos de *PCD*, los jasmonatos pueden actuar de manera antagónica tanto favoreciendo como reprimiendo el proceso en función de las especies ROS inicialmente presentes, así como de las diferentes interacciones que se establezcan entre dichas moléculas (Overmyer *et al.*, 2000; Danon *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha demostrado que el MeJa influye en la producción de ROS en las células guardianas de los estomas. Mientras que el cierre estomático es inducido por MeJa, un inhibidor de la enzima NAD(P)H que inhibe la producción de ROS. Sin embargo, la alteración génica de estas oxidasas en *Arabidopsis sp.* afecta negativamente el papel del MeJa, impidiendo el cierre de los estomas y generando la consiguiente producción de ROS (Suhita *et al.*, 2004; Munemasa *et al.*, 2007).

Otro de los compuestos volátiles más ampliamente estudiado en plantas superiores es el etileno. Esta sencilla molécula es considerada una fitohormona y su implicación en numerosos procesos fisiológicos vegetales ha sido ampliamente reconocida. Su rango de actuación varía desde el fenómeno conocido como “triple respuesta” donde afecta la expansión celular en hojas y plántulas en germinación, inhibe la elongación del epicotilo en condiciones de oscuridad y ocasiona un incremento en la curvatura del ápice; hasta influir procesos de senescencia, crecimiento de brotes y raíces, la epinastia, inducir la floración y maduración del fruto, la diferenciación celular, el desarrollo y reproducción, regular la respuesta ante situaciones de estrés de naturaleza biótica y abiótica, o presentar efectos morfogenéticos entre otros (Abeles *et al.*, 1992; Tomás-Barberán *et al.*, 1997; Poulev *et al.*, 2003; An *et al.*, 2010; Xu y Zhang, 2015).

Además, es capaz de interactuar con otras moléculas como los jasmonatos, el ácido giberélico o las auxinas, desencadenando diversas respuestas (Guo y Ecker, 2007; Licausi *et al.*, 2013) las cuales, a su vez, serán dependientes de la temporalidad, condiciones ambientales, tipo de tejido y/o estado fisiológico del vegetal.

A pesar de los avances en biología molecular y bioquímica, la naturaleza dinámica y en constante cambio de todos los procesos fisiológicos que acontecen en vegetales ha hecho que las vías por las que los diferentes COVs actúan o la finalidad de los mismos no sea a día de hoy del todo entendida.



## Los compuestos volátiles en algas

Al igual que las plantas superiores, las algas son capaces de liberar COVs (Jüttner, 1995), aunque hasta la fecha, las rutas de síntesis por las cuales estos procesos tienen lugar no han sido completamente establecidas.

La liberación de ciertos volátiles ha sido relacionada con aspectos climáticos varios. Estudios de campo han demostrado que la emisión de compuestos yodados derivados de macroalgas afecta la química atmosférica a nivel local (Küpper *et al.*, 2008; Chance *et al.*, 2009; Ball *et al.*, 2010; Seitz *et al.*, 2010). De manera específica, la presencia de estas sustancias en la troposfera modifica el patrón normal de formación de núcleos de condensación de nubes, altera el balance en el número de especies oxidantes libres y en consecuencia, la capacidad atmosférica para neutralizar estas especies así como diferentes contaminantes, se ve comprometida (Saiz-López *et al.*, 2012). De igual forma, la presencia de especies bromadas u otras especies reactivas de vida corta (en el orden de días a meses) en las capas atmosféricas de origen biogénico conduce a una distribución geográfica diferencial generando una variación espacial y temporal de las mismas (Carpenter y Liss, 2000; Leedham *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha observado que las emisiones derivadas de macroalgas rojas, en comparación con faeofitas y clorofitas, es superior en los trópicos (Santelices *et al.*, 2009), lo que podría generar variaciones estacionales en el clima.

En este sentido, los compuestos sulfurados, concretamente el dimetilsulfuro (DMS) y derivados, también se han propuesto como reguladores del clima a nivel global. En 1987, Charlston y colaboradores propusieron la Teoría CLAW, en la cual se establece que el compuesto dimetilsulfopropionato (DMSP) presente en las células del fitoplancton es liberado a la columna de agua donde es transformado a dimetilsulfuro (DMS), el cual difunde a través de la superficie hacia la atmósfera donde será rápidamente oxidado. Este proceso genera óxido de azufre y ácido metanosulfónico (MSA) pudiendo alterar el patrón normal de formación de los núcleos de condensación de nubes, lo que favorece la condensación de vapor de agua y generación de nubes sobre los océanos. El resultado final sería un enfriamiento de la superficie marina que modificaría la fisiología del fitoplancton, el cual reajustaría la emisión de DMS, comenzando de nuevo el ciclo. En este sentido, el DMS es uno de los compuestos más ampliamente estudiados en microalgas (Lovelock *et al.*, 1972; Liss *et al.*, 1994; Kiene *et al.*, 1996; Malin *et al.*, 1997; Malin y Kirst, 1997; Simó, 2001; Steinke *et al.*, 2002; Yoch, 2002), aunque también ha sido detectado en macroalgas, en algunos casos asociada su producción a la síntesis de etileno (Reed, 1983; Steinke y Kirst, 1996; Steinke *et al.*, 1998; Van Alstyne *et al.*, 2001; Plettner *et al.*, 2005). Van Alstyne, 2008, ofrece una revisión más detallada del papel del DMS y derivados en macroalgas.



Otros aspectos estudiados sobre la funcionalidad de estos compuestos en algas han sido enfocados desde un punto de vista económico o de interés para la población. Así, la capacidad antifúngica y antibacteriana que presentan algunos COVs les confiere propiedades interesantes que podrían ser empleadas de cara a una producción biotecnológica a gran escala. Por ejemplo, en la microalga verde *Chara globularis* se identificaron 5 esteroides y 12 compuestos lipídicos los cuales mostraban actividad antibacteriana moderada frente a *Staphylococcus aureus* (Bankova *et al.*, 2001); la especie *Shewanella* produce 15 compuestos volátiles que inhiben la actividad patógena del hongo *Aspergillus* sp. (Gong *et al.*, 2015) y los volátiles detectados en las algas *Actinotrichia fragilis*, *Liagora ceranoides* y *Colpomenia sinuosa* y analizados por cromatografía de gases-masa (GC-MS) y con detector de ionización de llama (GC-FID) revelaron asimismo actividad insecticida frente a *Oryzaephilus mercator* y *Tribolium castaneum*, y antibacteriana frente a *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Pasdaran *et al.*, 2016).

Asimismo, la mayor demanda en el consumo de algas como fuente de alimento a nivel global ha hecho necesario un seguimiento de estos productos y un control riguroso de sus diferentes propiedades organolépticas. En este sentido, los COVs presentes en las diferentes especies de algas pueden afectar de manera diversa sus cualidades especialmente aquellas directamente relacionadas con el olor y sabor, influyendo por tanto su viabilidad comercial. En este sentido, el estudio de los perfiles de volátiles a través de técnicas de cromatografía de gases acopladas con microextracciones en fase sólida (GC-DPME) está ayudando a discriminar entre los diferentes productos considerados aptos para el consumo (Yamamoto *et al.*, 2014)

Otro de los aspectos estudiados más importantes en referencia a los volátiles es el papel que desempeñan a nivel fisiológico, tanto de manera individual como en sinergia con otros compuestos. Así por ejemplo, el ET de manera coordinada con el óxido nítrico (NO) determina el proceso de muerte celular en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Yordanova *et al.*, 2010), y se ha sugerido un posible papel como transmisor de señales de respuesta ante situaciones de estrés entre células adyacentes (Zuo *et al.*, 2012).

También se ha observado como la aplicación exógena de compuestos volátiles conduce a modificaciones fisiológicas varias. Por ejemplo, el tratamiento con ET produce diversos cambios morfogénicos en la especie *Acetabularia* en función del tiempo de tratamiento (Vanden Driessche *et al.*, 1988) y en la macroalga verde *Ulva intestinalis* regula de manera negativa el contenido pigmentario en clorofilas tras la aclimatación a un régimen de luz (Plettner *et al.*, 2005).

De manera similar, el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* bajo diferentes concentraciones de ácido jasmónico afectó de manera diferencial la fisiología de esta especie: mientras que concentraciones elevadas en el rango de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M provocaron la reducción y degradación de pigmentos fotosintéticos, proteínas y monosacáridos así como la disminución en el pH del medio de cultivo; concentraciones inferiores, entre  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M, aumentaban los niveles de pigmentos fotosintéticos, proteínas y monosacáridos, favorecían la acumulación y secreción de proteínas solubles y estabilizaban el medio (Czerpak *et al.*, 2006).

De manera opuesta, los estudios de Vick y Zimmerman, (1983), con *Chlorella pyrenoidosa* mostraron que diferentes enzimas de la ruta de síntesis del JA se encontraban activas en dicha microalga y sin embargo, bajo condiciones de cultivo normales, ningún tipo de jasmonato fue detectado.

También en macroalgas se ha detectado la presencia del JA y derivados. Así, en *Gelidium latifolium*, Krupina y Dathe, (1991), mediante cromatografía de gases identificaron varios compuestos jasmonatos; en *Lithothamnion corallioides* y *Gracilariopsis lemaneiformis* se detectó actividad enzimática de enzimas de la ruta de síntesis de los octadecanoides (Hamberg, 1992; Hamberg y Gerwick, 1993) y el estudio de la fase haploide en *Chondrus crispus* ha mostrado la síntesis de diversas oxilipinas así como la capacidad inductora del MeJa (Bouarab *et al.*, 2004).

De manera paralela, se ha visto como la aplicación de MeJa estimula la formación de ROS lo que conduce a la oxidación lipídica y la degradación de los pigmentos clorofila *a* y ficocianina en *Gracilaria dura* (Kumari *et al.*, 2015), e induce la síntesis de florotaninos en la macroalga *Fucus vesiculosus* demostrando la capacidad de la misma de reconocer y emplear las oxilipinas suministradas de manera externa (Arnold *et al.*, 2001).

Otro de los aspectos fisiológicos en los cuales se ha propuesto la implicación de los volátiles en algas es como metabolitos de defensa, estabilizadores o protectores frente a condiciones variables del medio. Se ha sugerido la posibilidad de que diversos grupos de estos compuestos funcionen como moléculas señalizadoras para relacionarse e interactuar con el entorno, pudiendo actuar incluso de manera opuesta. Por ejemplo, se ha visto como la liberación de aldehídos por un lado reduce el desarrollo de los huevos de copépodos (Pohnert *et al.*, 2002) funcionando como un mecanismo defensivo a nivel poblacional (Ianora *et al.*, 2006), y alternativamente pueden funcionar como repelente frente al grazing de diversos crustáceos (Jüttner, 2005).

También el cultivo de la microalga *Scenedesmus incrassulatus* bajo diferentes temperaturas y tras la inducción con el volátil MeJa mostró como la adición de este compuesto al medio inhibía el crecimiento de bacterias patógenas de manera proporcionalmente directa al aumento de temperatura, mejoraba su crecimiento como respuesta a estrés térmico e incrementaba el contenido proteico de sus células (Christov *et al.*, 2001).

Por otro lado sin embargo, estudios realizados en el alga verde *Ulothrix fimbriata* han mostrado que la emisión de COVs, principalmente de compuestos lipooxygenados, les confiere la capacidad para actuar como sustancias 'atravesantes' para diversos predadores, tales como el caracol *Radix ovata* (Fink *et al.*, 2006a,b). Se desconoce si esta función de atracción podría ser un mecanismo de defensa indirecta, tal como ocurre en plantas superiores (Radhika *et al.*, 2010).

También en macroalgas la presencia de estos compuestos ha sido relacionada con la respuesta defensiva (Bouarab *et al.*, 2004). Por ejemplo, en el alga parda *Laminaria digitata*, la presencia de ácidos grasos, específicamente el ácido araquidónico, linolénico y el metil jasmonato fue asociada a un aumento en la concentración de ROS, indicando que la oxidación de estos compuestos podría jugar un papel desencadenante en la defensa en algas pardas (Küpper *et al.*, 2009). Sin embargo, y en oposición a esta supuesta función defensiva, Wiese-meier y colaboradores, (2008), no detectaron la presencia del JA ni de metabolitos derivados en siete especies de algas pardas estudiadas: *Dictyota dichotoma*, *Colpomenia peregrina*, *Ectocarpus fasciculatus*, *Fucus vesiculosus*, *Himantalia elongata*, *Saccharina latissima* (formalmente conocida como *Laminaria saccharina*) y *Sargassum muticum*. Asimismo, mostraron que la aplicación de JA y MeJa en estos organismos no representó cambios significativos en la síntesis de metabolitos secundarios ni incrementó la respuesta defensiva frente a organismos potencialmente patógenos, por lo que los autores concluyeron que si bien estas sustancias desempeñan un papel relevante en plantas superiores, es posible que en algas pardas no actúen de igual forma por lo que es difícil establecer conclusiones al respecto y parece que nuevas investigaciones deben ser llevadas a cabo.

A pesar de los trabajos referidos sobre la funcionalidad de los volátiles en algas, su papel no ha sido claramente asociado a un proceso determinado. En este sentido se observa como existe una gran disparidad tanto en la naturaleza de los volátiles, en la respuesta generada por el organismo, así como en el propio organismo que la genera. Parece por tanto que el esfuerzo investigador se ha focalizado principalmente en identificar el mayor número de compuestos posibles en organismos, más que por caracterizar los procesos que regulan o el papel que desempeñan. Esto, acompañado por una alta variabilidad en la metodología empleada (Materic *et al.*, 2015), ha generado en muchos casos resultados especulativos difíciles de interpretar y estandarizar.

En la siguiente tabla se muestran algunos de los grupos de compuestos volátiles emitidos que han sido identificados en diversos grupos de algas (Tabla 1).

**Tabla 1: Diferentes compuestos orgánicos volátiles encontrados en especies algales.**

Compuesto	Referencia
Aldehídos	Sun <i>et al.</i> , 2012; Yamamoto <i>et al.</i> , 2014.
Alcoholes	Sun <i>et al.</i> , 2012.
Ésteres	Sun <i>et al.</i> , 2012; Yamamoto <i>et al.</i> , 2014; Gong <i>et al.</i> , 2015.
Alcanos, alquenos	Youngblood y Blumer, 1973; Duursma y Dawson, 1981; Rezanka <i>et al.</i> , 1982; Broadgate <i>et al.</i> , 2004; Gong <i>et al.</i> , 2015.
Compuestos halogenados	Burreson <i>et al.</i> , 1976; Abrahamsson <i>et al.</i> , 1995; Genovese <i>et al.</i> , 2009; Cabrita <i>et al.</i> , 2010; Bravo-Linares <i>et al.</i> , 2010; Sun <i>et al.</i> , 2012.
Compuestos sulfurados	White, 1982; Caron, 1990; Ikawa <i>et al.</i> , 2001; Amsler, 2008; Bravo-Linares <i>et al.</i> , 2010; Alcolombri <i>et al.</i> , 2015.
Bromofenoles	Liu <i>et al.</i> , 2011.
Apocarotenos	Yamamoto <i>et al.</i> , 2014.

De entre todos los compuestos identificados en los diferentes grupos de algas destacan de manera especial los compuestos carbonados y los sulfurados. Los compuestos carbonados son altamente diversos y se caracterizan por presentar una cadena de átomos de carbono de número variable, las cuales pueden combinarse con diferentes grupos como el cloro, el yodo, el bromo o el flúor, dando lugar a los compuestos halogenados. Asimismo, dentro de este grupo de compuestos carbonados se incluyen los alcanos y cicloalcanos (p.e: metano, hexano), los alquenos, los hidrocarburos aromáticos (p.e: benceno, tolueno), los terpenos (p.e: limoneno), alcoholes (p.e: propanol), glicoles y derivados, aldehídos, cetonas, ácidos o ésteres entre otros.

Los compuestos halogenados se encuentran de manera predominante en las macroalgas rojas, en las cuales aproximadamente el 90% de los compuestos sintetizados contienen bromo o cloro, en oposición a algas verdes y pardas con un 7% y 1% respectivamente (Harper *et al.*, 2001). Presentan actividad antifúngica y antibacteriana frente al daño ocasionado por organismos diversos (p.e: epífitos, endófitos o herbívoros), actuando como inhibidores y

repelentes. En algunos casos, la capacidad de síntesis de estos compuestos es tal que su acumulación acaba presentando efectos biotóxicos, tanto para el propio vegetal como en diferentes niveles de la cadena trófica (Ianora *et al.*, 2006; Cabrita *et al.*, 2010), pudiendo incluso inhibir el crecimiento, tal como ocurre en la microalga verde *Chlorella pyrenoidosa* (Ikawa *et al.*, 2001). Dentro de este grupo, los compuestos yodados como el yoduro de metilo, los clorados como el cloruro de metilo o los bromados como el bromoformo, así como derivados de los mismos, han sido los estudiados de manera más común en algas (Mithoo-Singh *et al.*, 2017). Por ejemplo, la producción de bromuro de metilo, bromoformo y yoduro de metilo fue detectada bajo condiciones de laboratorio en 11 especies de macroalgas de las costas de California (Manley, 1992). Estos compuestos, entre otros, fueron también identificados tras el cultivo de diferentes especies de macroalgas simulando condiciones polares, estableciendo para cada una un perfil específico de acuerdo a la emisión de los mismos, lo cual podría servir posteriormente como 'huella' para su identificación (Schall *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 2014). También en microalgas se ha detectado la síntesis de sustancias yodadas, sugiriéndose en algunos casos que eran estos, más que las macroalgas, los principales productores (Klick y Abrahamsson, 1992).

Sin embargo y como se ha referido, el mayor énfasis por detectar la presencia de estos compuestos más que por dilucidar los aspectos asociados a su síntesis, liberación y consecuentemente su funcionalidad, ha hecho que si bien tenemos certeza de su existencia y amplia variedad, desconocemos los diferentes matices que rigen su comportamiento.

### **Factores que afectan la emisión de volátiles en algas**

Como se ha visto la producción y emisión de estos compuestos en algas es afectada, al igual que ocurre en plantas superiores, por diversos factores tales como la presencia de herbívoros, diferentes tipos de estrés por herida o daño inducido, tipo y estado del alga (p.e: la edad del tejido o la etapa de maduración del mismo), la disponibilidad y tipo de luz, las condiciones de salinidad o pH e incluso la temporalidad. Todos ellos afectan la producción y emisión de estos compuestos con diferente eficiencia, mostrando en algunos casos, tendencias muy marcadas en su estacionalidad (Jüttner *et al.*, 1986; Mtolera *et al.*, 1996; Amsler, 2008; García-Jiménez *et al.*, 2013; Leedham *et al.*, 2015; Mithoo-Singh *et al.*, 2017).

Sin embargo y como se ha mencionado, a pesar del considerable número de trabajos existentes en relación a la ocurrencia de volátiles en algas, su función en referencia a un evento determinado no ha sido establecida de manera específica.

Evidencias del papel de los volátiles en algas a nivel de crecimiento y desarrollo existen en el medio natural al observar cómo el número de talos con estructuras reproductivas aumenta y/o disminuye de manera abrupta. De igual manera, es posible encontrar la presencia de determinados mantos algales los cuales repentinamente desaparecen a favor de otro tipo de especies de algas (García-Jiménez, comunicación personal). De manera paralela, durante estos eventos un 'olor' o 'aroma' característico es percibido, lo que hace suponer que algún volátil, o grupo de volátiles, se encuentre presente y debido a su inherente naturaleza volátil, pudiese actuar como molécula señalizadora.

Asimismo, se sabe que el desarrollo y maduración de las estructuras reproductoras en algas es influenciado por diferentes aspectos tanto ambientales: disponibilidad de nutrientes, rangos de temperatura, subida y/o bajada de marea (procesos de desecación y aumento de la salinidad) o condiciones lumínicas (Cole y Sheath, 1990), así como endógenos u hormonales. En este sentido es asumible por tanto que si estos compuestos volátiles se encuentran de manera natural en el ambiente, o son liberados por las algas como respuesta a algún condicionante ambiental, pudiesen estar actuando como desencadenantes del proceso reproductivo, tanto de manera individual como en cooperación con alguno de los factores previamente referidos.

No obstante, el interés por entender el funcionamiento de estos compuestos y su papel bajo condiciones que afecten específicamente el desarrollo de los organismos algales ha supuesto que en 2013, García-Jiménez y colaboradores planteasen un estudio para investigar su comportamiento bajo diferentes regímenes de luz. Así, los talos de *Gelidium arbuscula* fueron sometidos a diferentes longitudes de onda: luz de amplio espectro, luz roja que afecta específicamente el proceso fotosintético y un régimen de oscuridad donde no existe crecimiento. De manera paralela, se aplicó etileno de manera exógena como compuesto regulador del crecimiento en las algas rojas. Los autores clasificaron los compuestos atendiendo a los grupos químicos funcionales, y establecieron un total de seis grupos diferentes: compuestos metil-alquilo, aminas, derivados del proceso de oxidación de lípidos, haluros, sulfuros y etileno (García-Jiménez *et al.*, 2013). Asimismo, los resultados mostraron de manera concluyente que existen perfiles diferenciales en la emisión de estos volátiles en función de las distintas condiciones experimentales; condiciones que al mismo tiempo, se sabe influyen en el crecimiento y desarrollo de las algas. Así, el cultivo bajo condiciones de luz blanca y oscuridad reveló una mayor producción de compuestos metil-alquilo y aminas, mientras que productos derivados de la oxidación de ácidos grasos, tales como alquenos, fueron predominantes bajo luz roja. Asimismo, el tratamiento exógeno con etileno mostró capacidad tanto para estimular y regular la producción de estos volátiles, así como la propia producción del mismo en el alga (García-Jiménez *et al.*, 2013).

De los seis grupos identificados en la macroalga roja *G. arbuscula*, nos centraremos en dos de ellos, el etileno (ET) y el metil jasmonato (MeJa), cuyo papel como inductores en el desarrollo de las algas rojas parece especialmente relevante.

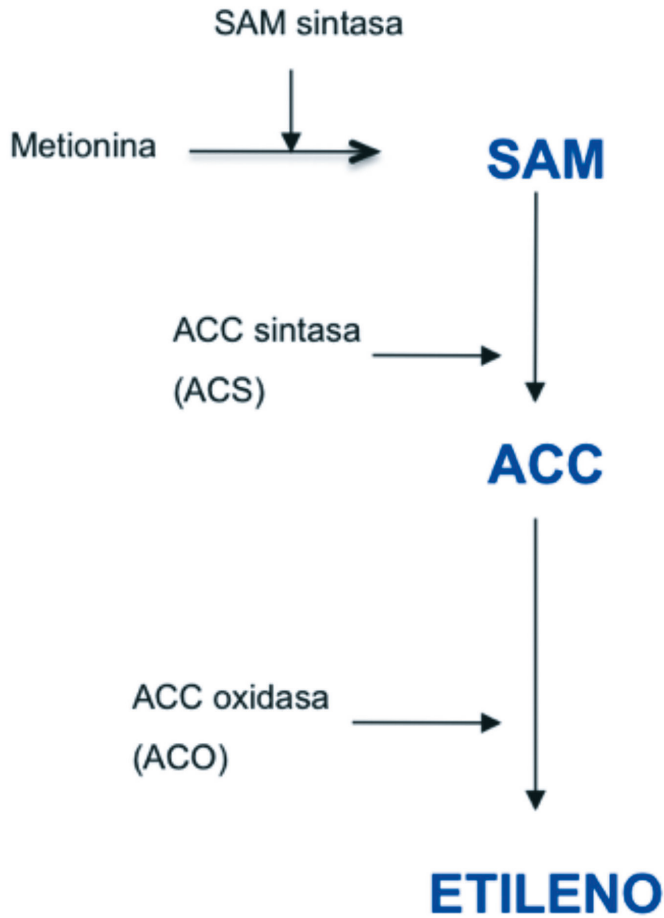
Focalizándonos en el proceso reproductivo, se ha observado como la aplicación exógena de ET regula diversos aspectos de la carpoesporogénesis en diferentes especies de algas rojas. Por ejemplo, en *Pyropia yezoensis* (Uji *et al.*, 2016) el tratamiento con ACC (sustrato de la ACC sintasa y precursor del etileno) favorece la formación de gametos masculinos, o espermatias, y esporas; mientras que en *Pterocladia capillacea* el tratamiento con etileno induce la formación y maduración *in vitro* de las estructuras tetraesporangiales (García-Jiménez y Robaina, 2012). Así en este alga, tanto la emisión de ET, la actividad de las enzimas ACS (ACC sintasa) y ACO (ACC oxidasa) involucradas en su síntesis, así como la concentración de la poliamina Putrescina (Put) fueron cuantificadas tras la incubación del alga con ET a diferentes tiempos (García-Jiménez y Robaina, 2012). Los resultados mostraron i) que la producción de ET está correlacionada con la actividad enzimática de ACC y ACO y, ii) la concentración de Put incrementa al mismo tiempo que la liberación de etileno, infiriéndose que las rutas de síntesis de las poliaminas y del etileno trabajan en sinergia (García-Jiménez y Robaina, 2012).

Por otro lado, la aplicación exógena de MeJa en los talos de *Grateloupia imbricata* ha mostrado un incremento en el número de cistocarpos así como la coexistencia de las fases reproductivas donde en un mismo individuo es posible encontrar carpoesporangios y tetraesporangios a las 48 h posteriores al tratamiento (García-Jiménez *et al.*, 2016). Asimismo, el tratamiento con este volátil muestra una reducción en el tiempo de formación de las estructuras reproductivas y por otro, estimula la apertura de las mismas o dehiscencia con la consiguiente liberación de esporas.

A la vista de estos resultados parece claro que de manera especial, el ET y el MeJa influyen en diferentes aspectos del proceso de carpoesporogénesis en algas rojas. No obstante, los datos a nivel molecular por los cuales se rigen estos procesos siguen siendo escasos y desafortunadamente, a día de hoy apenas existe información sobre las vías de señalización y percepción asociadas al mismo.

Para el ET, la ruta de síntesis principal en algas parece coincidente con la identificada en plantas superiores, la cual fue dilucidada por Adams y Yang, 1977, en la cual primeramente se propuso la S-adenosil-metionina (SAM) como intermediario entre la metionina y el etileno, y posteriormente se concluyó que es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

(ACC) el producto intermedio en la conversión de la metionina a ET, estableciéndose lo que se conoce como 'Ciclo de la Metionina' (Fig. 1).



**Figura 1: Ruta de síntesis del etileno. SAM: S-adenosil-Metionina; ACC: ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico.**

En un primer paso, la metionina se sintetiza a S-adenosil-metionina (SAM) mediante la acción de la SAM sintasa (SAMs). Seguidamente, la SAM es convertida a ACC por acción de la enzima ACC sintasa (ACS). A continuación, ACC es convertido a ET por acción de la enzima ACC oxidasa (ACO) liberando  $\text{CO}_2$ .

Aunque las enzimas responsables del proceso, en primera instancia, son SAMs, ACS y ACO, existen numerosos factores adicionales que condicionan el resultado de



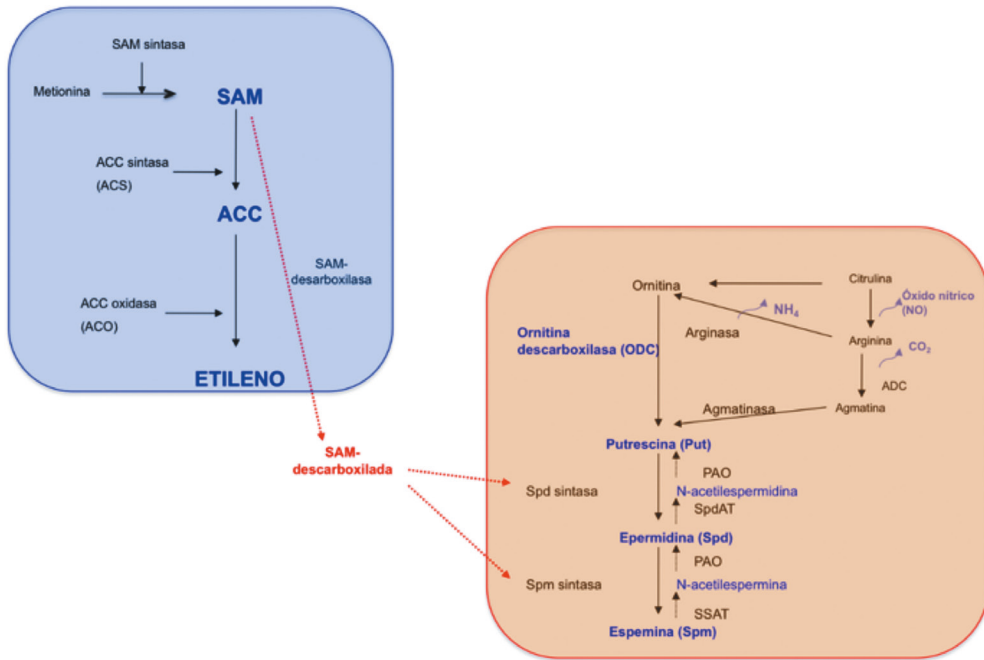
estas reacciones. Así, factores abióticos como sequía o daño mecánico, el estado de desarrollo o el tipo de tejido del vegetal, estimulan o inhiben la actividad de dichas enzimas variando los niveles de síntesis de ET en los organismos (Abeles *et al.*, 1992; Xu y Zhang, 2015).

En algas, de manera paralela a la vía 'clásica' descrita en plantas superiores se ha identificado una vía de síntesis alternativa a partir del acrilato (Yoch *et al.*, 1997; Niki *et al.*, 2000). El acrilato ha sido propuesto como precursor del ET (Abeles, 1973; Watanabe y Kondo, 1976), el cual se genera a partir del dimetilsulfopropionato (DMSP) por acción de la enzima DMSP liasa, la cual produce además la liberación del gas dimetil sulfuro (DMS). Se ha comprobado que esta ruta está presente en diferentes especies de micro y macroalgas (Reed, 1983; Steinke y Kirst, 1996; Steinke *et al.*, 1998; Van Alstyne *et al.*, 2001; Plettner *et al.*, 2005) y, en algunos casos, su producción ha sido asociada a la síntesis de etileno.

Por ejemplo, en la macroalga roja *G. arbuscula* se estableció la hipótesis de que tanto la emisión de ET como de DMS pudiesen estar relacionadas a través de la vía de la DMSP liasa. En este sentido se planteó un experimento de evolución en el tiempo donde se medían los niveles de DMS y ET simultáneamente. Se comprobó que a lo largo del tiempo, si bien los niveles de ET incrementaban, no lo hacía el DMS. Por tanto, se demostró que la vía de síntesis de etileno a través de la DMSP liasa no era una ruta principal de síntesis en esta macroalga. Esta conclusión fue corroborada con la determinación tanto *in vivo* como *in vitro* de DMS. En este caso, aún asumiendo que la producción *in vivo*, es decir, todo el DMS producido procedía de la descomposición del DMSP, los niveles detectados eran un orden de magnitud inferior a los niveles detectados *in vitro* (García-Jiménez *et al.*, 2013).

Establecido por tanto que la ruta de síntesis principal del ET en algas ocurre mediada por la enzima ACC, así como el papel de dicho compuesto en la inducción y formación de las estructuras reproductoras *in vitro*, la caracterización de la fisiología del etileno a nivel molecular será de gran importancia.

En este sentido por tanto, el papel de SAM se presenta como especialmente importante debido a su implicación en diferentes rutas biosintéticas, en las cuales funciona como nexo de unión entre las mismas. Así, existe una interconexión entre la ruta de síntesis de las PAs y el ET, donde y a través de la descarboxilación de SAM se generan grupos aminopropilos, los cuales serán necesarios para la síntesis de las poliaminas espermidina (Spd) y espermina (Spm) (Fig. 2).



**Figura 2: Esquema de la relación existente entre las rutas de síntesis de las poliaminas (naranja) y el etileno (azul). Los principales genes seleccionados para el estudio de expresión se muestran en negrita.**

La síntesis de las poliaminas (PAs) en algas tiene lugar predominantemente a través de la enzima ODC (Marián, 2002; Sacramento *et al.*, 2004). La ODC sintetiza la putrescina (Put) mediante la descarboxilación del aminoácido ornitina. Posteriormente, la Put a través de la adición de grupos aminopropilos dirigida por la espermidina sintasa (Spds) sintetizará espermidina. A su vez, esta Spd mediante la Spm sintasa (Spms) generará Spm.

Asimismo, el control de los niveles de PAs vendrá dado por la acción de enzimas de la ruta catabólica aminooxidasas (AAO) y poliaminooxidasas (PAO) (Sacramento *et al.*, 2007).

En estas rutas de síntesis, etileno y poliaminas, las reacciones de oxidación y reducción generan compuestos de especies reactivas las cuales afectan el crecimiento y desarrollo del vegetal. Estas especies están bajo el control de diversas enzimas, entre las que destaca el papel de la ascorbato peroxidasa (APX) una de las enzimas de secuestro más ampliamente evaluada en algas (Sano *et al.*, 2001; Kitajima *et al.*, 2002; García-Jiménez *et al.*, 2016). De manera específica, APX además de su capacidad como *scavenger* o eliminadora de ROS, ha sido asociada a procesos fisiológicos como el desarrollo del fruto o la

transición a la etapa reproductiva en plantas superiores (Noctor y Foyer, 1998; Agrawal *et al.*, 2003; Matamoros *et al.*, 2003).

Asimismo, las proteínas WD40 y citocromo P450, y sus correspondientes genes, han sido relacionados con diferentes aspectos fisiológicos así como con la respuesta a cambios frente a diferentes tipos de estrés, tales como la salinidad, temperatura o deshidratación (Liu y Zhu, 1997; Brands y Ho, 2002; Ramanjulu y Bartels, 2002; Lee *et al.*, 2010; Pinot y Beisson, 2011; Maksup *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2014). Por ejemplo, el citocromo P450 puede participar simultáneamente en procesos de desarrollo, crecimiento o síntesis de metabolitos secundarios (Krochko *et al.*, 1998; Fujioka y Yokota, 2003; Saito *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2008; Sotelo-Silveira *et al.*, 2013).

También en plantas superiores, la expresión de genes relacionados con las vías de señalización y síntesis del ET se ha evaluado durante procesos de maduración del fruto y polinización (Vriezen *et al.*, 2008; Pascual *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). De esta manera, se ha observado como en tomate, diversos genes correspondientes a las enzimas ACS y ACO muestran expresión diferencial en función del estado de maduración del tejido.

En algas, Uji y colaboradores, 2016, han observado en *P. yezoensis* como numerosos genes se expresan de manera diferencial en relación a la tolerancia a estrés y división celular como respuesta a tratamiento exógeno con ACC.

En este estado en el cual la homeostasis se ve comprometida, diferentes rutas metabólicas serán activadas y/o inhibidas con el fin de paliar toda la carga negativa generada como resultado del proceso reproductivo y así, intentar asegurar la viabilidad del vegetal (Caverzan *et al.*, 2012).

Por otro lado, el proceso de oxidación de los ácidos grasos en plantas superiores da como resultado la formación de unos compuestos conocidos como oxilipinas, cuyo papel en diferentes procesos fisiológicos así como en la respuesta a diferentes tipos de estrés ha sido ampliamente documentado (Andersson *et al.*, 2006). Dentro de este grupo se encuentra el ácido jasmónico (JA) y sus derivados comúnmente conocidos como jasmonatos, los cuales incluyen el metil jasmonato (MeJa), jasmonil-isoleucina (JA-Ile) o jasmonoil ACC (JA-ACC) entre otros.

En vegetales superiores, la síntesis del JA y sus derivados ocurre a través de la vía de los octadecanoides con el ácido linolénico como precursor y, mediante la oxidación enzimática mediada por enzimas lipooxigenasas (LOX) o  $\alpha$ -dioxigenasas se obtiene ácido jasmónico

(Beale y Ward, 1998; Fernández Calvo, 2011; Yan *et al.*, 2013; Fernández-Barbero, 2015). Así, el proceso de síntesis del metil jasmonato a partir del JA es mediado por el sustrato SAM, el cual sirve como dador de grupos metilo y finalmente la enzima JMT (*Jasmonic Acid Methyl Transferase*) transforma el JA en MeJa (Roje, 2006; Zhao *et al.*, 2013).

Al igual que en el caso del ET, la generación de especies ROS tiene lugar durante la formación del metil jasmonato como resultado del metabolismo de óxido-reducción que acontece durante este proceso (Miller *et al.*, 2010, Weinberger *et al.*, 2011). En relación se espera por tanto que la implicación de enzimas reguladoras que mantengan bajo control estas sustancias ocurra. Así, por ejemplo, APX, WD40 y citocromo P450 podrían verse afectadas por la generación y/o presencia del metil jasmonato.

Por otro lado, los factores de transcripción (FTs) MYB están involucrados en el control del ciclo celular en plantas. Asimismo, estos FTs son capaces de interaccionar con las proteínas JAZ (*Jasmonate Zim Domain*) y regular procesos como la maduración del polen, el desarrollo del estambre o la dehiscencia de las anteras (Song *et al.*, 2011). Asimismo, afectan diferentes aspectos de la fertilidad en vegetales (Mandaokar *et al.*, 2003, 2006; Cheng *et al.*, 2009; Mandaokar y Browse, 2009).

Finalmente y desde un punto de vista génico, diferentes genes involucrados en aspectos varios de la obtención de jasmonatos han sido identificados en macroalgas. Por ejemplo, en *Chondrus crispus* se identificaron dos genes codificantes de lipooxigenasas (Collén *et al.*, 2013), una de las cuales presentaba un alto grado de identidad con una LOX identificada previamente en *Porphyra purpurea* (Liu y Reith, 1994); así como genes codificantes para las enzimas 12-OPDA reductasa y 12-OPDA reductasa dioxigenasa. A pesar de haberse detectado la presencia de MeJa *in vitro*, no se encontraron genes candidatos para JMT, lo que sugiere que quizás en *C. crispus* la obtención de MeJa es mediada por la acción de enzimas diferentes (Collén *et al.*, 2013). Por otro lado, la secuenciación del alga parda *Ectocarpus siliculosus* sí permitió la caracterización de genes para las enzimas AOS y AOC, mientras que de nuevo no se identificaron candidatos para JMT (Cock *et al.*, 2010).

De manera única y en relación a los genes *MYB*, los cuales en plantas superiores actúan en la transmisión de señales entre diferentes vías de señalización y están implicados en la regulación de los niveles de ROS (Al-Attala *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2016), se ha encontrado un gen que codifica un FT de este tipo en *C. crispus* y cuyo dominio presenta similitud con aquel de *Chlamydomonas* sp., *Ostreococcus* sp. y *Cyanidioschyzon*

sp., pero no se ha evaluado su función a nivel génico (Collén *et al.*, 2013). También en *C. crispus*, se han encontrado genes relacionados con la respuesta a estrés y defensa. Así, 2 genes codificantes para la enzima *scavenger* APX, y varios genes y pseudogenes para diferentes proteínas WD40 se han identificado. Adicionalmente, se han caracterizado 17 genes y 3 pseudogenes que codifican para enzimas citocromo P450, las cuales han sido relacionadas con diversos aspectos del vegetal como la eliminación de grupos metilos derivados de moléculas de esteroles o la hidroxilación de carotenoides entre otros (Lepesheva y Waterman, 2004; Kim *et al.*, 2009).

Parece por tanto evidente, la existencia de una intrincada red de componentes detrás de cada proceso fisiológico que ocurre en el vegetal. Más aún, la implicación de numerosas enzimas de manera simultánea hace pensar que existe una variedad de genes encargados de la codificación de las mismas y cuya expresión génica determinará el comportamiento mostrado durante la carposporogénesis.

En este sentido y como primera aproximación al estudio de la red génica involucrada en el proceso reproductivo en algas rojas, se han seleccionado 6 genes, además del ya establecido *GiODC*, que creemos pueden estar relacionados con la vía de síntesis y oxidación de los jasmonatos en algas: *MT* (un gen codificante para una enzima metil transferasa); *JMT* (JA-metil transferasa); *citocromo P450* y *WD40* (genes implicados en la respuesta a estrés); *APX* (eliminación de especies ROS) y *MYB* (un gen que codifica un FT implicado en diversos procesos fisiológicos) (Ambawat *et al.*, 2013).

Para medir la expresión de los genes seleccionados, se ha optado por la técnica de amplificación digital o dPCR por sus siglas en inglés (*digital PCR*), la cual fue descrita por primera vez en 1992 (Sykes *et al.*, 1992). De manera muy general, su funcionamiento se basa en la idea de diluir una muestra en miles de 'muestras individuales' es decir, crear particiones de la muestra inicial de manera que cada una de las 'submuestras' sea sometida a una reacción de amplificación individual. De esta manera, mediante el recuento total de las submuestras y la identificación de aquellas positivas (detección de la secuencia de interés) frente a las negativas (no detección) es posible determinar cuantas copias de la secuencia estudio había en la muestra inicial. Actualmente existen dos variantes: i) las amplificaciones se desarrollan en 'chips' y, ii) en gotas (*droplet dPCR*, ddPCR). En este trabajo se empleó la opción de amplificación por gotas, la cual divide la muestra en gotas mediante la emulsión con aceite. Las muestras se cargan en unas pequeñas placas las cuales se introducen en un generador de gotas automático para, posteriormente, transferirlas a otra placa para su amplificación. A continuación, esta placa se coloca en un 'lector de gotas', que funciona como un citómetro

de flujo para analizar cada gota y determinar si la reacción ha ocurrido o no. La clasificación de las gotas en positivas frente a negativas se hace en base a la amplitud de su fluorescencia. La fluorescencia en este caso, se debe al fluoróforo Eva Green, el cual se intercala de manera inespecífica entre la doble hebra de ADN y es capaz de trabajar en condiciones saturantes sin inhibir el correcto desarrollo de la reacción. A pesar de que esta técnica se conoce desde hace tiempo, y diversos estudios comparativos aseguran que la dPCR ofrece más exactitud y menos ambigüedad que la qPCR a la hora de detectar secuencias poco comunes, ya que evita el uso de curvas de calibrado y controles internos, a día de hoy no se ha introducido de manera común en los laboratorios principalmente por el alto coste que conlleva la implementación de todo el proceso de amplificación, tanto a nivel temporal como de recursos fungibles.

## Hipótesis y objetivos del capítulo

A la vista de los antecedentes previos, parece claro que el etileno y el metil jasmonato desempeñan un papel importante durante el proceso de la carposporogénesis en algas rojas, de manera predominante durante el desarrollo del cistocarpio *in vitro*. Por ello, planteamos que existe una red de genes asociados a ambas rutas de síntesis, afectando diversos aspectos de las mismas y en consecuencia, determinando el proceso de formación de las estructuras reproductoras en las macroalgas.

### Objetivo 1

- Seguimiento de la expresión de los principales genes relacionados con la ruta de respuesta y síntesis del etileno (*ACC sintasa (ACS)* y *SAM sintasa (SAMs)*); ruta de síntesis de poliaminas (*GiODC*, *Spd sintasa (Spds)* y *SAMs*) y el control de sus niveles (*AAO*); respuesta a estrés (*WD40* y *citocromo P450*) y disminución de ROS (*APX*), tras la inducción con el compuesto volátil etileno, en tejido fertilizado y fértil de la macroalga roja *G. imbricata*.

### Objetivo 2

- Seguimiento de la expresión del gen de estudio, *GiODC*, y seis genes propuestos como relacionados con el metabolismo de los jasmonatos en algas: *JMT* y *MT* (codificantes para una JA-metil transferasa y una enzima metil transferasa); *citocromo P450* y *WD40* (genes implicados en la respuesta a estrés); *APX* (eliminación de especies ROS) y *MYB* (desarrollo, señalización y eliminación de ROS), en tejido fertilizado y fértil de la macroalga roja *G. imbricata*.

## Material y Métodos

### Objetivo 1

#### 1.1: Condiciones experimentales

El material de partida empleado fue recolectado y tratado según lo descrito en el apartado 1.1 del Material y Métodos general. Asimismo, los talos se seleccionaron y clasificaron como se detalla en el apartado 1.2 del Material y Métodos general.

A partir del tejido fresco y previamente separado, se introdujeron 5 g en recipientes de plástico con 200 mL de agua de mar filtrada (previamente esterilizada por autoclave) y se trataron de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.2 del Material y Métodos general.

Durante este tiempo y para monitorizar la expresión génica, se tomaron 100 mg de muestra a las 24 h, 48 h y 168 h, los cuales se homogeneizaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de la extracción de ARN.

#### 1.2: ARN y transcripción inversa

El proceso de extracción de ARN y síntesis de ADNc se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en los apartados 4 y 5 del Material y Métodos general.

#### 1.3: Diseño de cebadores

Secuencias génicas obtenidas del transcriptoma de *G. imbricata* se emplearon para la confirmación de la secuencia mediante el diseño de cebadores con el programa Primer 3 (Tabla 2). Estos genes se emplearon en diversas amplificaciones sobre ARN, obteniéndose las secuencias específicas correspondientes a los mismos. Las nuevas secuencias obtenidas se emplearon para el diseño de cebadores específicos, sondas, para la ddPCR mediante dos programas diferentes: el software Universal ProbeLibrary Assay Design Center (La Roche) (<https://lifescience.roche.com>) y PrimerQuest Tool (IDT) (<http://eu.idtdna.com/primerquest/home/index>). Para evitar posibles problemas a la hora de la amplificación, tales como *mispriming* o la formación de productos no específicos, todos los juegos fueron previamente comprobados *in silico* mediante el programa OligoAnalyzer v. 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) (Tabla 3).



**Tabla 2: Cebadores empleados para las amplificaciones sobre ARN de *Grateloupia imbricata*.**

Gen	Orientación	Secuencia (5'-3')
<i>ODC</i>	F R	CGTTTTCATGGCCAGGGAAA TCGAGCTTGGCCTCAACTTA
<i>A00</i>	F R	CTCCGGCATCATCTCGA CGCAATTGGGTAACGTGA
<i>ACS</i>	F R	AGAAGCATTCTCCCCGA CCGTTGCCACAAAACCTATT
<i>APX</i>	F R	GCCTTCGTCAGGAGGAC GAGTGGATACCGTGCTGACA
<i>SAMs</i>	F R	AAGGACCCACCAAAGTTGA CTCCGCATCAGACTTCTTG
<i>Spds</i>	F R	CCAGGCGTTGCATTTGCATA CGTCTCGTCGGCTTACTTTG
<i>WD40</i>	F R	CATCTGCAACTGGTCAGA CCCATGAAGATGTCGCAA
<i>citocromoP450</i>	F R	CAGCAGTGGCAATTCGTCTA GGAGGATGAAACACAGGAA

**Tabla 3: Sondas empleadas para la detección de la expresión génica.**

Gen	Orientación	Amplicón estimado (nt)	Secuencia (5'-3')
<i>ODC</i>	F R	68	CGCAGACGCGACACAGTA TCACCAGAATGTTAGCGAAGA
<i>A00</i>	F R	62	CGGAGCTCACCGAAAGTAAG TGTATCGCTGAGCGCTTTT
<i>ACS</i>	F R	101	GAACCAGGCCCATACAAGA AGCAACTGCGGAAACATA
<i>APX</i>	F R	65	GCCTTCGTCAGGAGGAC CTTGATTCATTCCGTCTCG
<i>SAMs</i>	F R	61	CCGGACACATAATCCGTGA TAGGCAGCCGTCTTGGAGT
<i>Spds</i>	F R	64	GTATCAGATAGTTGCTGACGATCC CGAGAGATACGCACTAGTCTCAA
<i>WD40</i>	F R	64	GGCGCACATCCCAATACTT CTATCAACGCTCTCGCCACT
<i>citocromoP450</i>	F R	65	CCAGGACACGGATAGACTCG GAGTGGATACCGTGCTGACA

## 1.4: Expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis

Para la optimización de la técnica se realizó una tabla de doble entrada para ajustar la temperatura óptima de hibridación de los cebadores de cada gen, y las cantidades requeridas de ADNc necesarias para llevar a cabo la ddPCR. El ADNc de trabajo para esta puesta a punto procede de diferentes estadios de desarrollo del material algal.

Las temperaturas probadas fueron desde 50 a 60 °C con un incremento de 0,5 °C, mientras que las concentraciones fueron 50, 100 y 150 ng. Las temperaturas finalmente seleccionadas fueron 55 °C para *ODC*, *AAO*, *ACS*, *APX*, *citocromo P450* y *WD40*; 55,4 °C para *Spds* y 58 °C para *SAMs*.

La mezcla de reacción se realizó de acuerdo a lo presentado en la tabla 4.

**Tabla 4: Reactivos empleados en las reacciones de amplificación digital por gotas.**

Componentes de la PCR	Volumen en la reacción (µL)
QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)	10 µL
Cebador F (10 µM)	1 µL
Cebador R (10 µM)	1 µL
ADNc (dilución 1/10)	1,5 µL
Completar con agua libre de ARNasas.	6,5 µL

Para la amplificación, se diseñó un protocolo de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y en base las temperaturas de cada juego de cebadores. El protocolo consiste en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 seg, y posteriormente 1 min a la temperatura de *annealing* en función de cada juego de cebadores. Finalmente, un paso a 4 °C durante 5 min y 90 °C durante 1 min son necesarios para estabilizar la señal. En los casos en los que las T<sup>as</sup> de los cebadores fueron menores de 55 °C, se incluyó un paso de elongación a 72 °C durante 45 seg de manera posterior a la etapa de alineamiento. Todos los cambios de temperatura se producían de manera gradual mediante la inclusión de una 'rampa' de 2 °C/ seg.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y la preparación de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del proveedor Bio-Rad. Cada volumen de reacción (volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , tabla 4), se cargaron en un *cartridge* (Cat. No. 186-4007, Bio-Rad) con capacidad para 8 muestras. A continuación, se añaden 70  $\mu\text{L}$  de aceite (Cat. No. 186-3005, Bio-Rad) por cada celdilla (muestra) en el *cartridge*, y se tapa con un *gasket* (una pequeña tira de plástico) (Cat. No. 186-4007, Bio-Rad). A continuación, se introduce en el generador de gotas. Transcurridos aproximadamente dos minutos, las gotas formadas se extraen del generador y se transfieren a una placa de 96 pocillos (12 x 8) para PCR (Cat. No. 0030128.605, TwinTec, Eppendorf, Hamburg, Germany) mediante una pipeta multicanal (Rainin, Mettler-Toledo, Giessen, Germany). Este proceso de generación de gotas y transferencia a la placa tiene que realizarse tantas veces como muestras queramos analizar, ya que cada *cartridge* únicamente tiene capacidad para 8 muestras y es un paso muy importante para la correcta amplificación posterior. El tiempo máximo desde la generación de las primeras gotas hasta el comienzo de la amplificación no puede superar los 45-60 min, con el fin de asegurar la integridad de las mismas. Una vez la placa esté completamente cargada, debe sellarse automáticamente en un sellador PX1 con un film de aluminio (Cat. No. 181-4040, Bio-Rad) e introducirse en el termociclador para el proceso de amplificación.

Una vez concluido el proceso de amplificación, la placa se introduce en el lector de gotas QX200 Droplet Reader Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) donde se analizará mediante el software QuantaSoft v1.7 (Bio-Rad). Este programa cuantificará de manera absoluta la expresión de los genes y dará los valores de concentración en copias de transcrito  $\mu\text{L}^{-1}$ . Aunque no es imprescindible realizar el proceso de amplificación y lectura seguidamente, sí es recomendable que el lapso de tiempo entre ambos no supere las 48 h, debido a la degradación de las gotas y, en cualquier caso, éstas deben mantenerse refrigeradas a 4 °C.

Cada gen fue valorado para cada tipo de tejido (fertilizado y fértil) por triplicado. La expresión se cuantificó en los tres tiempos descritos (24, 48 y 168 h). Por tanto, para cada gen y tipo de tejido se realizaron nueve valoraciones. De igual forma se amplificaron muestras sin tratar como controles ( $n=2$ ) para cada tipo de tejido y gen, a los mismos tiempos previamente establecidos. Las muestras control correspondientes a cada gen y tipo de tejido se sometieron a seis valoraciones. Asimismo, se incluyó una muestra control o blanco (*NTC: no template control*) para cada placa de reacción. En aquellos casos en que más de un gen era incluido en una placa, un *NTC* por gen era incorporado.

Una vez explicada la metodología general del proceso, y determinadas las concentraciones óptimas de ADNc y las T<sup>as</sup> óptimas para cada juego de cebadores, se realizaron amplificaciones para un total de 240 muestras.

## 1.5: Análisis estadístico

Los datos de expresión absoluta fueron determinados de manera automática por el software QuantaSoft v1.7 (Bio-Rad). Posteriores análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa R-Studio (<http://www.rstudio.com/>). Para detectar diferencias significativas en los niveles de expresión génica de cada gen, se realizó primeramente un test de análisis de la varianza (ANOVA) seguido del correspondiente Test HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey. Las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) se estudiaron de manera individual para el 'tipo de tejido' (fertilizado vs fértil) y para la 'clase' (muestras tratadas vs controles). Los análisis se realizaron para cada uno de los tiempos: 24 h, 48 h y 168 h.

## Objetivo 2

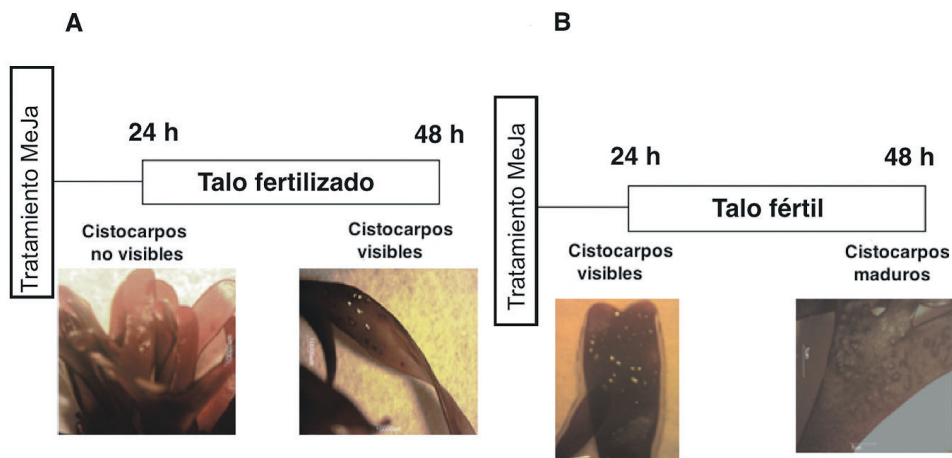
### 2.1: Condiciones experimentales

El material de partida empleado fue recolectado y tratado según lo descrito en el apartado 1.1 del Material y Métodos general. Asimismo, los talos se seleccionaron y clasificaron como se detalla en el apartado 1.2 del Material y Métodos general.

Una vez seleccionados, aproximadamente 100 mg de tejido fresco fueron introducidos en placas de Petri estériles y tratados tal como se describe en el apartado 2.3 del Material y Métodos general.

De acuerdo a lo descrito, para monitorizar la expresión génica, se tomaron 100 mg de muestra a las 24 h y 48 h, los cuales se homogeneizaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de la extracción de ARN.

El seguimiento de la maduración del tejido se hizo de manera visual. Los talos fertilizados, aquellos sin cistocarpos visibles o con coloración rojiza clara a las 24 h mostraron cistocarpos, a modo de pequeñas punteaduras (rojo-marrón claro) a las 48 h. Los talos fértiles por otro lado, con cistocarpos visibles como pequeños puntos rojo-marrón claro a las 24 h, mostraron cistocarpos bien desarrollados a las 48 h (Fig. 3).



**Figura 3:** Esquema simplificado del proceso de maduración de los cistocarpos presentes en tejido fertilizado (A) y tejido fértil (B) durante las 48 h posteriores al tratamiento de inducción con metil jasmonato.

## 2.2: ARN y transcripción inversa

El proceso de extracción de ARN y síntesis de ADNc se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en los apartados 4 y 5 del Material y Métodos general.

## 2.3: Diseño de cebadores

A partir de secuencias génicas obtenidas del transcriptoma de *G. imbricata* y de acuerdo a lo descrito previamente en el apartado 1.3 del Objetivo 1 (*Expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis*) del presente capítulo, se diseñaron cebadores para i) diversas amplificaciones sobre ARN (Tabla 5), y posteriormente ii) para la obtención de sondas para la ddPCR (Tabla 6).

**Tabla 5: Cebadores empleados para las amplificaciones sobre ARN de *Grateloupia imbricata*.**

Gen	Orientación	Secuencia (5'-3')
<i>ODC</i>	F R	CGTTTTTCATGGCCAGGGAAA TCGAGCTTGGCCTCAACTTA
<i>JMT</i>	F R	GTGTGCGTGGATGTAGGATAG GCTCCAATCTCGTTCTCACTT
<i>MYB</i>	F R	ATCCCGCACTGTCGATTATTT CCGTTGTCTGTATGCTCTGTGC
<i>MT</i>	F R	ACAGTCCCTCTCAGGTTTCTA CTCGATCAACAGCCCTTCT
<i>WD40</i>	F R	CATCTGCAACTGGTCAGA CCCATGAAGATGTCGCAA
<i>citocromoP450</i>	F R	CAGCAGTGGCAATTCGTCTA GGAGGATGAAACCACAGGAA

**Tabla 6: Sondas empleadas para la detección de la expresión génica.**

Gen	Orientación	Amplicón estimado (nt)	Secuencia (5'-3')
<i>ODC</i>	F R	68	CGCAGACGCGACACAGTA TCACCAGAATGTTTAGCGAAGA
<i>JMT</i>	F R	110	ACTTCTCGGCGAAGGATTTT CGCTCACTTATACGCCACAA
<i>MYB</i>	F R	63	ACGGAGCTTGTGATCGTCTC TTTCCGGGACGTTTACTGAA
<i>MT</i>	F R	81	CGAAGCATTGACCACCTAA GTTACTTGTCTGCGTGAACCTG
<i>WD40</i>	F R	64	GGCGCACATCCAATACTT CTATCAACGCTCTCGCCACT
<i>citocromoP450</i>	F R	65	CCAGGACACGGATAGACTCG GAGTGGATACCGTGTGACA

## 2.4: Expresión génica por acción del metil jasmonato durante la carpoesporogénesis

Para la optimización de la técnica se realizó una tabla de doble entrada para ajustar la temperatura óptima de hibridación de los cebadores de cada gen, y las cantidades requeridas de

ADNc necesarias para llevar a cabo la ddPCR. El ADNc de trabajo para esta puesta a punto procede de diferentes estadios de desarrollo del material algal.

Las temperaturas probadas fueron desde 50 a 60 °C con un incremento de 0,5 °C, mientras que las concentraciones fueron 50, 100 y 150 ng. Las temperaturas finalmente seleccionadas fueron 55 °C para *ODC*, *citocromo P450* y *WD40* y 55,4 °C para *JMT*, *MT* y *MYB*.

La mezcla de reacción se realizó de acuerdo a lo presentado en la tabla 4.

El procedimiento de amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 1.4 del Objetivo 1 (*Expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis*) del presente capítulo.

Cada gen fue valorado para cada tipo de tejido (fertilizado y fértil) por triplicado. La expresión se cuantificó en los dos tiempos descritos (24 y 48 h). Por tanto, para cada gen y tipo de tejido se realizaron seis valoraciones. De igual forma se amplificaron muestras sin tratar como controles (n=2) para cada tipo de tejido y gen, a los mismos tiempos previamente establecidos. Las muestras control correspondientes a cada gen y tipo de tejido se sometieron a cuatro valoraciones. Asimismo, se incluyó una muestra control o blanco (*NTC*) para cada placa de reacción. En aquellos casos en que más de un gen era incluido en una placa, un *NTC* por gen era incorporado.

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de ADNc y las  $T^{as}$  óptimas para cada juego de cebadores, se realizaron amplificaciones para un total de 120 muestras.

## 2.5: Análisis estadístico

Los datos de expresión absoluta fueron determinados de manera automática por el software QuantaSoft v1.7 (Bio-Rad). Posteriores análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa R-Studio (<http://www.rstudio.com/>). Para detectar diferencias significativas en los niveles de expresión génica de cada gen, se realizó primeramente un test de análisis de la varianza (ANOVA) seguido del correspondiente Test HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey. Las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) se estudiaron de manera individual para el 'tipo de tejido' (fertilizado vs fértil) y para la 'clase' (muestras tratadas vs controles). Los análisis se realizaron para cada uno de los tiempos: 24 h y 48 h.

## Resultados

### Expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis

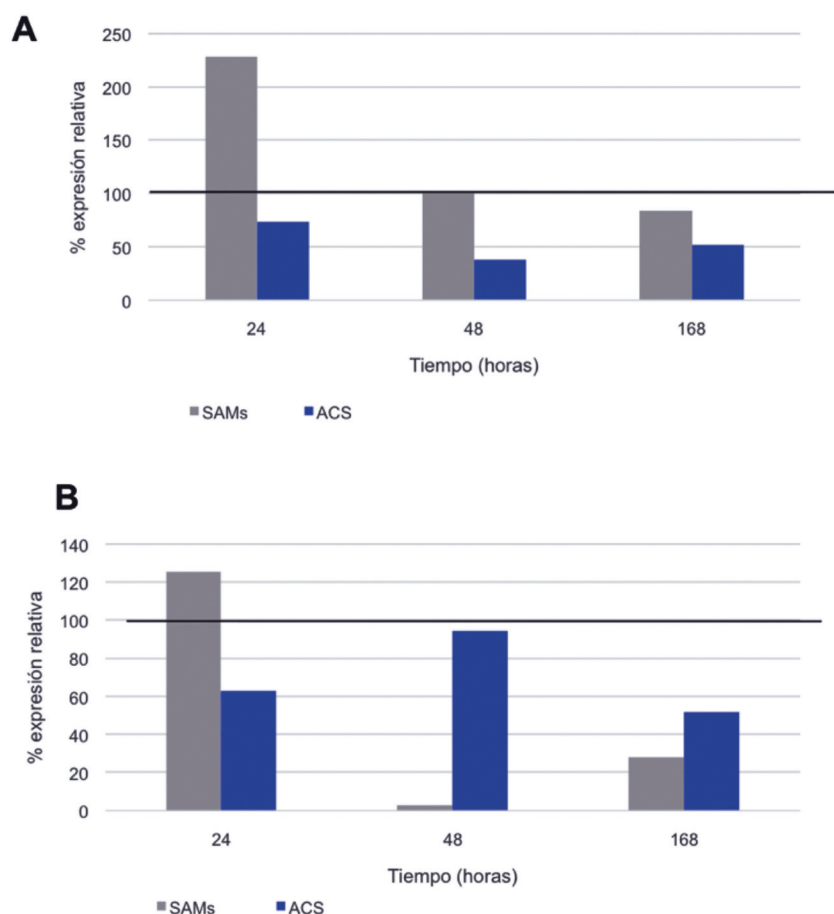
De manera general los resultados muestran un comportamiento génico diferencial atendiendo a la ruta biosintética en la que se engloban (etileno, poliaminas y estrés) y la tendencia en la expresión a lo largo del tiempo (24 h, 48 h y 168 h) cuando se analiza tejido fertilizado y fértil respectivamente. Asimismo se encontraron diferencias significativas para los genes evaluados al comparar las muestras tratadas con sus controles (Tabla 7).

**Tabla 7: Test estadístico ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) en función del tipo de tejido (fértil vs fertilizado) y para la clase (muestras tratadas vs controles). (\*) representa diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).**

Gen	Tipo de tejido	Clase
<i>ODC</i>	*0,007	*3,383e-07
<i>SpDs</i>	0,328	*0,047
<i>AAO</i>	0,703	*4,495e-04
<i>SAMs</i>	0,039	*4,874e-05
<i>ACS</i>	0,5	*0,008
<i>APX</i>	0,348	*4,295e-12
<i>Citocromo P450</i>	*1,671e-05	*1,31e-05
<i>WD40</i>	0,695	*9,142e-05

En relación a los genes que codifican enzimas de la ruta biosintética del ET (*SAMs* y *ACS*) se presenta sobreexpresión de la SAM sintasa, en relación a su control, a las 24 h tanto en talos fertilizados como en aquellos fértiles (Fig. 4). Para *ACS* la expresión medida fue siempre inferior, acercándose a los niveles control (100%) a las 48 h después del tratamiento para tejido fértil (Fig. 4).

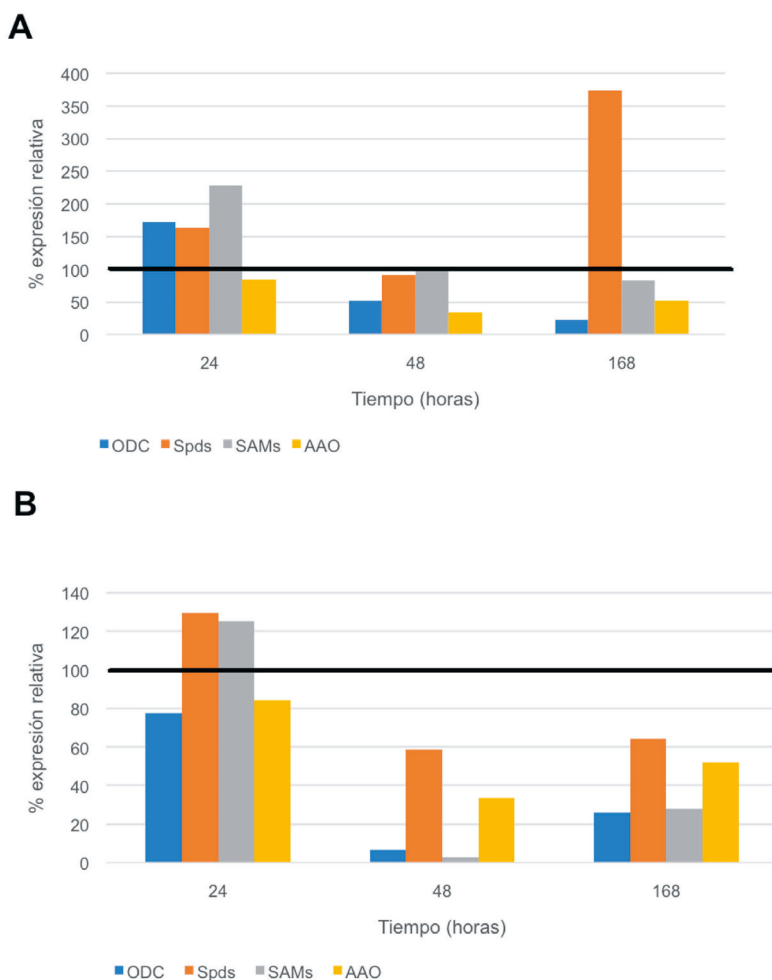




**Figura 4: Valores de expresión relativa de los genes codificantes de la ruta de síntesis del etileno (*SAMs* y *ACS*) en talos fertilizados (A) y fértiles (B).**

*SAMs*: S-Adenosil-metionina sintasa; *ACS*: ACC sintasa. La línea horizontal representa el 100% de expresión génica en muestras sin tratar para cada gen y tiempo de medida (n=2, expresión en copias  $\mu\text{L}^{-1} \pm \text{SD}$ ).

Gen	Fertilizado			Fértil		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
<i>SAMs</i>	0,28±0,03	0,84±0,02	0,12±0,08	0,75±0,06	0,78±0,02	1,01±0,03
<i>ACS</i>	0,57±0,04	1,49±0,07	0,33±0,02	1,45±0,02	0,18±0,01	0,85±0,02



**Figura 5: Valores de expresión relativa de los genes codificantes de la ruta de las poliaminas en talos fertilizados (A) y fértiles (B).**

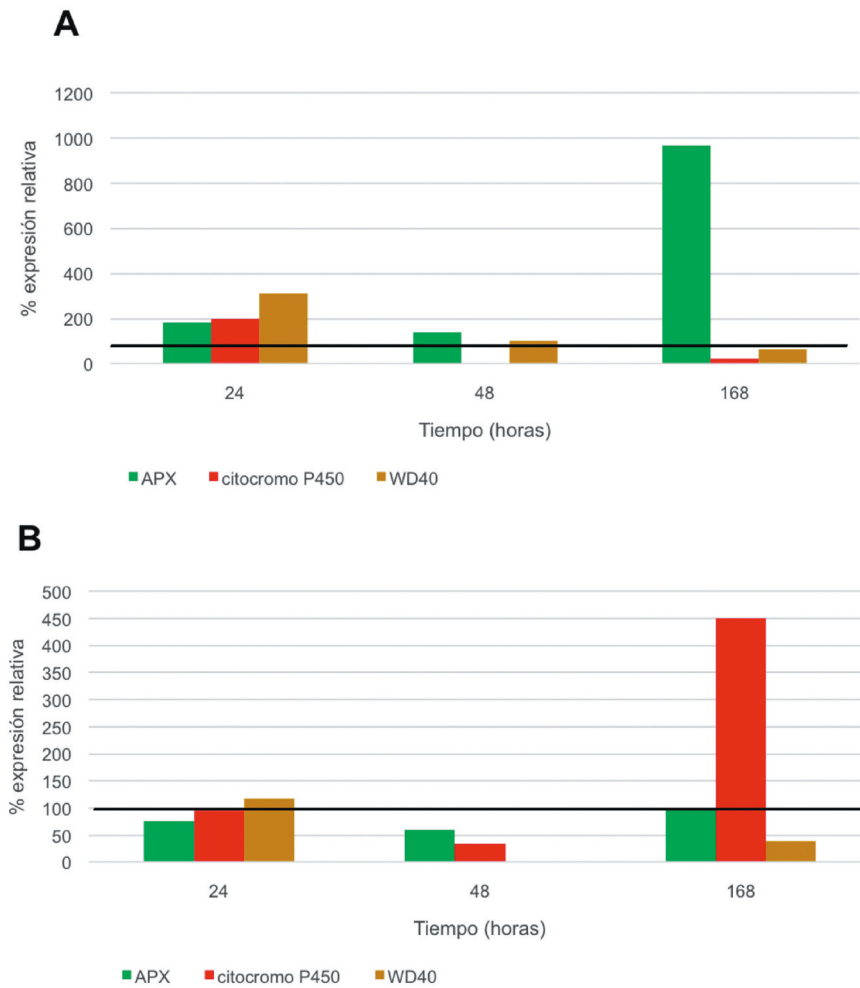
*ODC*: ornitina descarboxilasa, *Spds*: espermidina sintasa; *SAMs*: S-Adenosil-metionina sintasa; *AAO*: aminooxidasa. La línea horizontal representa el 100% de expresión génica en muestras sin tratar para cada gen y tiempo de medida (n=2, expresión en copias  $\mu\text{L}^{-1} \pm \text{SD}$ ).

Gen	Fertilizado			Fértil		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
<i>ODC</i>	0,25±0,02	0,95±0,04	0,13±0,09	1,17±0,02	0,31±0,07	0,69±0,02
<i>SAMs</i>	0,28±0,03	0,84±0,02	0,12±0,08	0,75±0,06	0,78±0,02	1,01±0,03
<i>AAO</i>	0,99±0,03	1,35±0,07	0,20±0,02	1,90±0,0	0,98±0,09	1,15±0,07
<i>Spds</i>	0,60±0,06	1,75±0,06	0,65±0,02	1,75±0,06	1,16±0,09	1,60±0,07

Atendiendo a la ruta biosintética de las poliaminas, todos los genes (*ODC*, *Spd sintasa* y *SAM sintasa*) son sobreexpresados en los talos fertilizados a las 24 h tras el tratamiento con ET, a excepción de la aminooxidasa. A las 168 h, cuando las primeras estructuras reproductoras comenzaron a visualizarse, se sobreexpresó el gen que codifica la Spd sintasa ( $2,43 \pm 0,09$  copias *Spds*  $\mu\text{L}^{-1}$  en talos tratados vs  $0,65 \pm 0,02$  copias *Spds*  $\mu\text{L}^{-1}$  en talos sin tratar) (Fig. 5). Esta sobreexpresión fue también observada en talos fértiles a los 24 h ( $2,27 \pm 0,08$  copias *Spds*  $\mu\text{L}^{-1}$  para talos tratados vs  $1,75 \pm 0,06$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  de la muestra sin tratar), para posteriormente disminuir por debajo del nivel base a las 168 h ( $1,03 \pm 0,09$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  *Spds* vs  $1,60 \pm 0,07$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  control) (Fig. 5).

En relación a los genes que codifican proteínas de estrés (*citocromo P450*, *APX* y *WD40*) se detecta sobreexpresión relativa a las 24 h en talos fertilizados. A las 168 h, sin embargo se obtienen únicamente valores máximos en la expresión relativa de APX ( $2,70 \pm 0,04$  copias *APX*  $\mu\text{L}^{-1}$  talos tratados vs  $0,28 \pm 0,02$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  talos sin tratar, Fig. 6).

Los talos fértiles revelan sobreexpresión relativa significativa a las 168 h de manera individual para el gen *citocromo P450* (Fig. 6).



**Figura 6: Valores de expresión relativa de los genes codificantes implicados en la respuesta oxidativa en talos fertilizados (A) y fértiles (B).**

APX: Ascorbato peroxidasa. La línea horizontal representa el 100% de expresión génica en muestras sin tratar para cada gen y tiempo de medida (n=2, expresión en copias  $\mu\text{L}^{-1} \pm \text{SD}$ ).

Gen	Fertilizado			Fértil		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
APX	0,32±0,09	6,60±0,02	0,28±0,02	4,70±0,02	2,75±0,06	8,40±0,09
Citocromo P450	0,24±0,06	0	0,26±0,10	0,70±0,09	0,30±0,02	0,04±0,05
WD40	0,16±0,06	1,20±0,04	0,03±0,04	0,84±0,04	0,24±0,06	0,80±0,09

## Expresión génica por acción del metil jasmonato durante la carposporogénesis

Para cumplir con el objetivo 2 y siguiendo lo indicado en el epígrafe 2.4: *Expresión génica por acción del metil jasmonato durante la carposporogénesis*, de material y métodos; los genes analizados tras el tratamiento exógeno con MeJa fueron *JMT*, *MT*, *ODC*, *citocromo P450*, *WD40* y *MYB*. De manera general, se detectó expresión génica significativa medida como copias  $\mu\text{L}^{-1}$  ( $p \leq 0,01$ ) en función del tiempo (24 h y 48 h) y el estado de desarrollo del material (tejido fertilizado vs fértil) (Tabla 8).

**Tabla 8: Test estadístico ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) en función del tipo de tejido (fértil vs fertilizado) y para la clase (muestras tratadas vs controles). (\*) representa diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).**

Gen	Tipo de tejido	Clase
<i>ODC</i>	0,12	2,06e-05*
<i>JMT</i>	0,12	0,13
<i>MT</i>	0,09	1,62e-05*
<i>MYB</i>	1,554e-16*	1,62e-17*
<i>Citocromo P450</i>	2,042e-05*	4,06e-11*
<i>WD40</i>	0,06	1,19e-05*

A la vista de los resultados, podemos destacar tres hechos principales: i) el tratamiento con MeJa incrementa la expresión de las muestras tratadas en comparación con los controles, ii) en los talos fertilizados existen un incremento en la expresión a las 24 h posteriores al tratamiento con MeJa para la mayoría de los genes evaluados y, iii) en los talos fértiles, con cistocarpos presentes, la expresión se mantiene en unos valores similares para ambos tiempos, 24 y 48 h, para todos los genes, con la excepción del gen *ODC* donde se observa un incremento en el número de transcritos a las 48 h (Tabla 9).

**Tabla 9: Valores medios de expresión (copias  $\mu\text{L}^{-1} \pm \text{SD}$ ) para los talos tratados con metil jasmonato ( $n=3$ ) a las 24 h y 48 h. **\*** indica diferencias significativas entre las muestras fertilizadas y fértiles a las 24 h y 48 h ( $p \leq 0,01$ ).**

Gen	Fertilizado		Fértil	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>ODC</i>	1,87 $\pm$ 0,15*	1,12 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,04*
<i>JMT</i>	3,77 $\pm$ 0,12*	1,08 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,06
<i>MT</i>	2,50 $\pm$ 0,17*	0,79 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,03
<i>MYB</i>	3,00 $\pm$ 0,26*	0,90 $\pm$ 0,10	0,96 $\pm$ 0,26	1,02 $\pm$ 0,44
<i>Citocromo P450</i>	3,60 $\pm$ 0,10*	1,07 $\pm$ 0,15	0,60 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,14
<i>WD40</i>	1,63 $\pm$ 0,02*	1,07 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,03

Asimismo, cuando se comparan los talos fertilizados tratados con MeJa a las 24 h y 48 h, se observa sobreexpresión del gen *GiODC* a las 24 h (1,87  $\pm$  0,15 copias  $\mu\text{L}^{-1}$ ) frente a 1,12  $\pm$  0,06 copias  $\mu\text{L}^{-1}$  a las 48 h. Esta tendencia se observa igualmente para los genes involucrados en la síntesis del MeJa (*MT* y *JMT*), los genes relacionados con la respuesta a estrés (*citocromo P450* y *WD40*) y *MYB* (Tabla 9).

Por otro lado, si comparamos los talos fértiles a las 24 h y 48 h, observamos expresión diferencial significativa para *GiODC* a las 48 h (1,11  $\pm$  0,04 copias  $\mu\text{L}^{-1}$ ), coincidente con el desarrollo completo de cistocarpos, en oposición a las 0,75  $\pm$  0,03 copias  $\mu\text{L}^{-1}$  obtenidas a las 24 h.

De manera opuesta, no se observaron diferencias significativas en la expresión del resto de los genes para los dos tiempos analizados.

## Discusión

La caracterización de la expresión génica en macroalgas durante el evento reproductivo de la carposporogénesis ha revelado información sustancial sobre el comportamiento de los genes durante la transición a la etapa reproductiva. Así, entendemos que los resultados presentados nos permitirán seguir avanzando en el conocimiento de la fisiología algal durante el proceso de reproducción. Una de las primeras evidencias que se puede destacar de este trabajo es la dificultad de comparar las expresiones entre los diferentes estadios de desarrollo. En *Grateloupia imbricata* solo es posible reconocer dos fases del ciclo de desarrollo de los cistocarpos, es decir, cuando están presentes o no las estructuras reproductoras. Esto evidentemente dificulta la comparación de los datos de expresión, en valores absolutos, para los diferentes genes, ya que no todas las algas se encuentran en el mismo estadio microscópico de desarrollo. A esta dificultad se le añade el hecho de que someter al alga a un tratamiento con un compuesto inductor de la reproducción evidentemente estimula la formación de los cistocarpos, pero nuevamente resulta en un proceso asincrónico. Por ello, se ha decidido abordar los resultados y la discusión de este trabajo en función de los valores relativos de expresión en relación a los talos sin tratar y se considerarán los valores absolutos cuando estos sean significativos.

### Caracterización de la expresión génica por acción del etileno durante la carposporogénesis

El ET es un hidrocarburo no saturado de fórmula molecular simple,  $C_2H_4$ , el cual bajo condiciones fisiológicas de temperatura y presión, se presenta como gas. A pesar de la relativa simplicidad de su estructura y composición, es considerado una fitohormona capaz de afectar y regular directamente diferentes procesos metabólicos y fisiológicos en plantas superiores, tales como el crecimiento de brotes y raíces, la epinastia, la inducción de la floración, maduración y abscisión del fruto, la diferenciación celular o el desarrollo, la reproducción, la senescencia, la caída de las hojas o el geotropismo de las raíces entre otros (Abeles *et al.*, 1992; Tomás-Barberán *et al.*, 1997; Poulev *et al.*, 2003; Cin *et al.*, 2005; An *et al.*, 2010; Xu y Zhang, 2015). Asimismo, es capaz de interactuar con otras moléculas como los jasmonatos, el ácido giberélico o las auxinas (Guo y Ecker, 2007; Licausi *et al.*, 2013) y actuar como molécula señalizadora regulando la respuesta ante situaciones de estrés de naturaleza biótica y abiótica (p.e: control de la generación y señalización de ROS) (Golemiec *et al.*, 2014; Sawicki *et al.*, 2015).

De igual forma, el etileno a nivel transcripcional es capaz de alterar la expresión de diversos genes implicados en múltiples vías biosintéticas. Por ejemplo, en *Arabidopsis* sp. se ha visto como un estudio evaluando la expresión de 6.000 genes, entre los que se incluyen genes de defensa, genes pertenecientes a diferentes rutas metabólicas tales como las auxinas, jasmonatos o azúcares, así como algunos de la propia ruta biosintética del ET, mostraron expresión alterada en respuesta a ET (Van Zhong y Burns, 2003).

Por otro lado y de manera específica, el ET ha demostrado influir varios aspectos del proceso reproductivo *in vitro* en diferentes especies de algas rojas (García-Jiménez y Robaina, 2012). Así, la aplicación exógena de ET sobre talos infértiles, en el alga roja *P. capillacea* induce la formación y maduración de las estructuras tetraesporangiales (García-Jiménez y Robaina, 2012). Asimismo, estas modificaciones fisiológicas han sido, a su vez, relacionadas de manera directa con la actividad enzimática de las enzimas de síntesis del ET, ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO); con la síntesis de putrescina, y con la liberación de etileno en este alga. En este sentido, se sabe que la interrelación entre las rutas biosintéticas del ET y las PAs tiene lugar a través del intermediario SAM, y los resultados obtenidos en *P. capillacea* parecen indicar que ambas rutas actúan en sinergia (García-Jiménez y Robaina, 2012).

A nivel génico, se ha comprobado como el ET es capaz de afectar la expresión de *ODC* en el alga roja *Grateloupia imbricata* (*GiODC*), por lo que este gen ha sido propuesto como candidato del proceso reproductivo en algas rojas durante el proceso de carposporogénesis *in vitro*. Así *ODC* revela expresión diferencial en función del estado del talo (fértil e infértil) y parte del talo (apical vs basal) (García-Jiménez *et al.*, 2009), del periodo de inducción y periodo de aparición de los cistocarpos, así como del tipo de inductor de la carposporogénesis (Montero-Fernández *et al.*, 2016).

También en el alga roja *P. yezoensis* la aplicación exógena de ACC, precursor del ET, mostró la sobreexpresión de genes relacionados con división celular en el tejido gametofítico, sugiriendo que el ET controla la transición a la etapa reproductiva y ocasiona cambios celulares dirigidos a la formación de las estructuras reproductivas (Uji *et al.*, 2016).

Por tanto, parece evidente que los cambios fisiológicos observados *in vitro* tras el tratamiento con ET durante el proceso reproductivo son el resultado de la regulación de los diferentes genes implicados en el mismo. Esencialmente y debido a la complejidad del evento de la carposporogénesis se hace necesaria la actuación conjunta de un grupo de genes que apoyen los cambios ocasionados. Más aún y considerando la posible interacción con la ruta de las poliaminas a través del intermediario común SAM, sería probable que la acción reguladora



del ET no sólo afecte a la propia ruta biosintética del ET, sino que se haga extensible a genes implicados en otras rutas, como aquella de síntesis de las PAs o aquellas implicadas en respuesta a estrés.

En este trabajo se ha determinado como el tratamiento con ET afecta de manera significativa la expresión de los genes evaluados en comparación con los controles sin tratar (Tabla 7).

Así, la expresión de los genes seleccionados y relacionados con las vías de síntesis del ET (*ACS* y *SAMs*), de las PAs (*ODC*, *Spds*, *AAO* y *SAMs*), y aquellos relacionados con estrés y regulación de especies reactivas durante periodos de estrés (*citocromo P450*, *WD40* y *APX*) se ha monitorizado durante una semana, en talos fertilizados y fértiles.

En talos fertilizados de *G. imbricata*, la sobreexpresión del gen que codifica la SAM sintasa ( $0,64 \pm 0,02$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  talos tratados vs  $0,28 \pm 0,03$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  talos sin tratar) a las 24 h (Fig. 4), está correlacionada con la síntesis de etileno y poliaminas. Considerando que la enzima SAM sintasa es la encargada de transformar la metionina en SAM, el sustrato principal de la ruta de síntesis del etileno y el dador de grupos aminopropilos para la síntesis de poliaminas, se puede inferir que tras el tratamiento con etileno existe un comportamiento sinérgico entre ambas rutas. Así, en tomate se ha visto como la sobreexpresión del gen *SISAMS1* (*SAM sintasa*) ocasiona la rápida conversión de Put a Spd y Spm (Gong *et al.*, 2014) y de igual forma, plantas de tabaco que sobreexpresan el gen *SAMDC* presentan mayores niveles de la fracción de PAs conjugadas solubles (Hu *et al.*, 2012), lo que indica una relación directa entre la actividad de SAM y la generación de PAs. De manera similar por tanto, estos resultados son asimismo coincidentes con lo previamente descrito en la macroalga roja *P. capillacea* donde la aplicación de etileno sobre sus talos inducía la síntesis de poliaminas de manera dependiente al tiempo de exposición al volátil (García-Jiménez y Robaina, 2012).

Por otro lado el patrón de expresión del gen que codifica la ACC sintasa, encargada de la transformación inicial de SAM en ACC, demuestra que la estimulación por etileno no activaría la síntesis de etileno *de novo* y de ahí que los niveles de expresión génica sean menores en comparación a aquella medida en los talos no tratados ( $0,42 \pm 0,01$  y  $0,56 \pm 0,03$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  para las muestras tratadas vs  $0,57 \pm 0,04$  y  $1,49 \pm 0,07$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  para las muestras sin tratar) a 24 y 48 h respectivamente.

En talos fértiles a las 24 h, esta misma tendencia de sobreexpresión génica de *SAMs* tras el tratamiento con ET y unos valores inferiores en la expresión del gen *ACS* apoyan los resultados previamente descritos en talos fertilizados. A pesar de que no es comparable la

expresión entre tejido fertilizado y fértil, sí sería aceptable inferir que el comportamiento de estos genes no se relaciona con el estadio reproductivo del alga. Resultados similares han sido obtenidos por Uji y colaboradores, 2016, los cuales identificaron un *contig* homólogo a un gen de ACC sintasa en *Pyropia yezoensis*. Este gen no mostraba diferencias significativas de expresión cuando se comparaba material gametofítico maduro e inmaduro.

Por el contrario, considerando los genes que codifican enzimas relacionados con la síntesis de las PAs (*ODC*, *Spds*, *SAMs* y *AAO*), sí se observa expresión génica diferencial de acuerdo al tipo de tejido (fertilizado vs fértil, Fig. 5). Así, en los talos fertilizados a las 24 h existe una sobreexpresión de estos genes a excepción del gen que codifica la aminooxidasa tras el tratamiento con etileno. Una vez los primeros cistocarpos aparecen (168 h), la expresión del gen para la Spd sintasa se incrementa significativamente ( $2,43 \pm 0,09$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  en las muestras tratadas vs  $0,65 \pm 0,02$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  muestras sin tratar, Fig. 5).

La presencia de Spd y Spm se ha correlacionado previamente con la maduración y liberación de las esporas en otras algas rojas (Guzmán-Urióstegui *et al.*, 2002; Sacramento *et al.*, 2004, 2007). Así en *G. imbricata*, Sacramento y colaboradores, 2004, demostraron que el cultivo *in vitro* de explantos con presencia de cistocarpos en medios conteniendo alguna de estas poliaminas favorecía el desarrollo de los cistocarpos. Por tanto, los elevados niveles de transcritos mostrados por *Spds* a las 168 h pueden relacionarse con la síntesis de Spd y Spm necesaria para que comiencen a visualizarse las estructuras reproductoras.

En talos fértiles, dado que el metabolismo de las poliaminas está activo por lo explicado previamente, parece normal que encontremos expresión del gen *AAO*, el cual codifica la enzima aminooxidasa, encargada junto a la enzima poliaminooxidasa, de mantener los niveles de las poliaminas, Put, Spd y Spm.

De manera particular mencionamos el papel del gen *ODC*, el cual presenta niveles menores de expresión en talos fértiles de *G. imbricata* lo que concuerda con los datos previos del grupo de investigación. *GiODC* presenta máxima expresión cuando los talos no presentan cistocarpos. Por tanto la monitorización de la expresión de *GiODC* en talos fértiles nos indica que esta expresión se ve reducida cuando los cistocarpos están presentes y disminuye aún más cuando el cistocarpo está completamente maduro a las 168 h ( $0,91 \pm 0,04$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  frente a  $0,18 \pm 0,07$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$ ) a las 24 y 168 h respectivamente.

Así, estudios previos mostraron como *GiODC* muestra expresión diferencial durante la formación del cistocarpo *in vitro*. Mediante el empleo de dos aproximaciones metodológicas, qPCR

e ISH, se demostró por un lado que los niveles de transcritos varían en función del tejido (zona basal del talo frente a la apical) y el grado de desarrollo o maduración del mismo (presencia o ausencia de cistocarpos), y por otro lado, como esta expresión está relacionada de manera proporcional a las actividades enzimáticas medidas previamente para la enzima ODC y los niveles endógenos de PAs (García-Jiménez *et al.*, 2009). Estos trabajos evidenciaron máximos tanto en los niveles de expresión de *GiODC* como en la concentración endógena de poliaminas en la zona basal del talo, donde no se encuentran cistocarpos, y cómo ambos disminuyen según el tejido madura reproductivamente y aparecen las estructuras reproductoras.

Posteriormente, se ha observado como la aplicación de diferentes inductores-fotoperiodo, etileno y metil jasmonato- sobre tejido infértil del alga altera asimismo los patrones de expresión del gen *ODC* en función tanto del tipo de inductor como del grado de desarrollo del tejido, afectando consecuentemente el desarrollo del proceso reproductivo *in vitro* (García-Jiménez *et al.*, 2016; Montero-Fernández *et al.*, 2016). De manera específica, se ha detectado como la aplicación de ET produce un incremento de expresión muy superior en comparación con el resto de inductores (450 veces superior) con respecto a los controles, justo tras el periodo de inducción lo que parece indicar que *G. imbricata* es capaz de detectar la presencia de etileno y producir una respuesta rápida y eficiente ante el estímulo (Montero-Fernández *et al.*, 2016). En este sentido, *GiODC* se caracteriza por contener en su zona 5'UTR diversos FTs relacionados con la respuesta a ET lo que implica una posible relación entre los mismos y la respuesta transcripcional mostrada por este gen (Montero-Fernández *et al.*, 2016).

En relación a los genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo: *APX*, *citocromo P450* y *WD40* revelan sobreexpresión en talos fertilizado a las 24 h, pero de manera notable los valores máximos para *APX* ocurren a las 168 h tras el tratamiento (Fig. 6)

En plantas superiores, la presencia de especies reactivas, tipo  $H_2O_2$ , se relaciona con el ablandamiento de los tallos de las plantas (Pilati *et al.*, 2014). Aunque en algas el conocimiento a nivel fisiológico está lejos de aquel de plantas superiores, nuestros datos permiten establecer como hipótesis que la formación de cistocarpos requiere de un mecanismo via ROS para ablandar igualmente el tejido y permitir el desarrollo de los cistocarpos. De ahí que en talos de *G. imbricata* tratados con etileno los genes relacionados se sobreexpresen a las 24h. Por otro lado, el comportamiento de *APX*, el cual codifica una de las enzimas más importante de secuestro de especies reactivas en algas (Sano *et al.*, 2001; Kitajima *et al.*, 2002; García-Jiménez *et al.*, 2016) muestra valores relativos máximos a las 168 h en tejido fertilizado lo que es coincidente con el momento de aparición de las estructuras reproductoras y parece apoyar la hipótesis de una posible función en la aparición de las mismas (Fig. 6).

No obstante, pocos estudios existen sobre el estudio de ROS en macroalgas, y de manera específica menos aún en referencia al efecto o papel que ejercen las mismas tras inducción con ET durante el proceso reproductivo, por lo que el conocimiento sobre cualquier aspecto referente a su fisiología es necesario. Al respecto, Uji y colaboradores (2016) observaron la sobreexpresión de varios genes potencialmente involucrados en la regulación de ROS, tales como catalasas o glutaredoxinas entre otros, en tejido gametofítico maduro tras la inducción con ET. Las catalasas catalizan la dismutación de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O^2$ , mientras que las glutaredoxinas favorecen la tolerancia ante estrés oxidativo en cianobacterias y plantas superiores (Rouhier *et al.*, 2008).

La sobreexpresión observada para el gen *citocromo P450* en tejido fértil a las 168 h podría identificarse con la finalización en el proceso de maduración de los cistocarpos ( $0,18 \pm 0,04$  copias  $\mu L^{-1}$  en material tratado frente a  $0,04 \pm 0,05$  copias  $\mu L^{-1}$  en material sin tratar). En plantas superiores, este gen ha sido relacionado con la respuesta a estrés oxidativo y como paliativo del daño celular ocasionado por el mismo (Pinot y Beisson, 2011). No obstante, su papel como regulador de distintos procesos de desarrollo en plantas superiores y en respuesta a inductores diversos, específicamente involucrado en ciertos aspectos del desarrollo de la semilla ha sido también destacado (Adamski *et al.*, 2009). Por ejemplo, en trigo (*Triticum aestivum* L.) la sobreexpresión del gen citocromo *TaCYP78A3* afecta de manera directa el tamaño de la semilla al provocar una mayor producción de células (Ma *et al.*, 2015). También en *Arabidopsis* sp. la sobreexpresión de otro gen tipo citocromo, *CYP78A9*, permite el crecimiento del fruto de una manera independiente al proceso de fertilización, lo que indica que los genes de la familia citocromo P450 regulan el crecimiento y desarrollo de los órganos reproductivos de manera autónoma al estado de madurez del tejido (Sotelo-Silveira *et al.*, 2013).

### **Caracterización de la expresión génica por acción del metil jasmonato durante la carposporogénesis**

El compuesto volátil metil jasmonato es un derivado lipídico de las oxilipinas con numerosas funciones reguladoras en vegetales. Esta sustancia así como los diferentes compuestos asociados, conocidos de manera general como jasmonatos, destacan por su capacidad para afectar diversos procesos fisiológicos en plantas superiores tales como la respuesta frente a situaciones de estrés, acumulación de compuestos y metabolitos secundarios, respuesta defensiva frente a ataque por patógenos o generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Overmyer *et al.*, 2000; Suhita *et al.*, 2003; Danon *et al.*, 2005; Munemasa *et al.*, 2007; Howe y

Jander, 2008; revisado en Yan y Xie, 2015). De manera similar, el MeJa ha sido asociado a diversos aspectos fisiológicos relacionados con el crecimiento y desarrollo en algas (Krupina y Dathe, 1991; Bouarab *et al.*, 2004; Küpper *et al.*, 2009).

Específicamente, se ha observado como la aplicación exógena de MeJa en talos infértiles de la macroalga roja *G. imbricata* modifica el patrón normal de desarrollo de las estructuras reproductivas *in vitro*: estimula y reduce su tiempo de formación a 48 h, provoca la apertura o dehiscencia de las mismas y muestra la presencia de fases mixtas (esporangios y cistocarpos) en un mismo talo del alga (García-Jiménez *et al.*, 2016).

De manera análoga a lo mostrado con el ET, se entiende que esta regulación mediada por jasmonatos se logra a través de la coordinación de varias rutas biosintéticas afectando en última instancia los diversos genes implicados en las mismas.

Hasta la fecha, se ha establecido el gen *ODC* como candidato a la reproducción debido a su comportamiento diferencial en función del estadio reproductivo y al tipo de inductor empleado (García-Jiménez *et al.*, 2009; Montero-Fernández *et al.*, 2016).

Asimismo, estudios previos *in silico* mostraron que la región 5' de *GiODC* contiene elementos reguladores (FTs) relacionados con la respuesta a volátiles, por lo que es probable la implicación de los mismos en las respuestas generadas.

No obstante, pocos datos más se conocen en relación al proceso reproductivo a nivel génico.

En este sentido, suponemos que debido a la complejidad del proceso de carposporogénesis, una variedad de genes, además de *ODC*, deben respaldar a nivel molecular los cambios que ocurren a nivel fisiológico en respuesta a MeJa. Más aún, estimamos que dichos genes deben por un lado estar involucrados de manera directa o indirecta en la ruta biosintética de los jasmonatos en algas y, por otro lado, deben ser capaces de responder a la señal del mismo, integrarla y transmitirla de manera que genere una respuesta acorde.

En plantas superiores se ha visto como el metil jasmonato está implicado en diferentes procesos fisiológicos actuando como señalizador en diferentes rutas biosintéticas y regula la expresión de un gran número de genes. Así, tanto el MeJa como otros compuestos derivados del ácido linolénico como el ácido jasmónico (JA), pueden activar la expresión de diversos genes cuya respuesta generará la acumulación de productos varios relacionados con la síntesis de jasmonatos (Seo *et al.*, 2001).

En algas hemos visto como el tratamiento con MeJa modifica la expresión de *GiODC* en comparación con las muestras sin tratar (Tabla 8).

En este sentido y para profundizar en el proceso reproductivo en algas rojas, creemos que existe más de una señal que induce el desarrollo de cistocarpos y que probablemente la vía de señalización del MeJa emplea estrategias distintas para responder a dichas señales.

En este trabajo, para evaluar la expresión a las 24 h y 48 h en talo fértil y fertilizado se propusieron dos genes de síntesis del MeJa que codifican para la enzima JA metil transferasa (*JMT*) y una metil transferasa (*MT*); *MYB*, un gen implicado en procesos de desarrollo y reproducción en plantas superiores, y *citocromo P450* y *WD40*, genes implicados en respuesta a estrés.

En plantas superiores, diferentes FTs MYB, pueden interaccionar con las proteínas JAZ y regular procesos como la maduración del polen, el desarrollo del estambre o la dehiscencia de las anteras en respuesta a ácido jasmónico (Song *et al.*, 2011). Por su parte, los genes *MYB* controlan diferentes procesos fisiológicos (Ambawat *et al.*, 2013), y en respuesta a diversas condiciones experimentales, se expresan en tejidos específicos del vegetal tales como en las anteras (Higginson *et al.*, 2003; Steiner-Lange *et al.*, 2003) o flores (Shin *et al.*, 2002), durante el desarrollo de la semilla o el comienzo de la floración (Gocal *et al.*, 2001; Woodger *et al.*, 2003). Asimismo, afectan diferentes aspectos de la fertilidad en vegetales (Mandaokar *et al.*, 2003, 2006; Mandaokar y Browse, 2009; Cheng *et al.*, 2009; Reeves *et al.*, 2012).

De manera adicional, los genes *MYB* pueden actuar en la transmisión de señales entre diferentes vías de señalización y están implicados en la regulación de los niveles de ROS (Al-Attala *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2016).

Los niveles de expresión detectados para *MYB* muestran sobreexpresión a las 24 h en talos fertilizados (sin cistocarpos visibles) tras la inducción con MeJa. La tendencia mostrada revela una acumulación máxima de transcritos a las 24 h ( $3,0 \pm 0,03$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$ ), la cual disminuye hasta unos niveles de expresión basales a las 48 h. A este tiempo, algunos cistocarpos se encuentran presentes en el tejido, si bien su grado de maduración y desarrollo no es completo. Este comportamiento sugiere una expresión transitoria por la cual los genes *MYB* son activados por la señal inductora del MeJa (o alguno de sus derivados, como el ácido jasmónico), generando una respuesta rápida en las primeras 24 h.

Por otro lado, la carposporogénesis supone la transición de una etapa vegetativa de crecimiento a una reproductiva lo que implica cambios complejos y a diferentes niveles fisiológicos

(p.e: degradación y síntesis de compuestos o elongación de tejidos entre otros) (Liszkay *et al.*, 2004; Carol y Dolan, 2006), los cuales generarán un exceso de carga oxidativa para el vegetal. En este estado, la síntesis de MeJa activa el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) generando derivados oxidados de los ácidos grasos y especies reactivas de oxígeno, tales como los radicales libres  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}^2$  y/o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Miller *et al.*, 2008; Weinberger *et al.*, 2011). La acumulación excesiva de este tipo de compuestos puede afectar de manera negativa el metabolismo celular, afectando diversos aspectos tales como el balance de especies de óxido-reducción (REDOX), interfiriendo en distintas rutas hormonales y/o modificando la expresión de diversos genes. En este estado en el cual la homeostasis se ve comprometida, se originará la síntesis de diversos compuestos que ayuden a reducir el daño oxidativo. Entre estos compuestos, encontramos las proteínas WD40 y citocromo P450 involucradas en distintos procesos de desarrollo en plantas superiores, así como responsables de paliar el daño celular ocasionado por diferentes tipos de estrés (Pinot y Beisson, 2011; Xu y Min, 2011).

De manera paralela, diferentes rutas metabólicas serán activadas con el fin de paliar esta carga negativa e intentar asegurar la viabilidad del vegetal (Caverzan *et al.*, 2012). Entre ellas, diferentes enzimas como la catalasa (CAT) o la enzima ascorbato peroxidasa (APX) además de su capacidad como *scavenger* o eliminadoras de ROS, han sido asociadas a procesos fisiológicos como el desarrollo del fruto o la transición a la etapa reproductiva en plantas superiores (Noctor y Foyer, 1998; Agrawal *et al.*, 2003; Matamoros *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios previos en talos fértiles e infértiles de *G. imbricata* mostraron como la tasa de peroxidación lipídica así como los valores de expresión de APX no presentan diferencias significativas tras la inducción con MeJa, demostrando que en este caso las ROS no ejercen un papel determinante en el desarrollo del cistocarpo en este alga (García-Jiménez *et al.*, 2016). Estos resultados indican que la generación de productos intermedios derivados de la peroxidación lipídica no requiere una activación génica previa y es independiente del estado de maduración del tejido algal.

Sin embargo, los valores de expresión obtenidos en este trabajo para los genes que codifican *citocromo P450* y *WD40* en tejido fertilizado muestran sobreexpresión a las 24 h posteriores al tratamiento con MeJa (Tabla 9).

A la vista de los resultados, parece que el MeJa produce una señal general la cual activa de manera inespecífica los genes evaluados en tejido fertilizado en las primeras horas posteriores al tratamiento. Así, todos los genes evaluados experimentan sobreexpresión a las 24 h siguientes al tratamiento lo que indica que en macroalgas rojas, los genes correspondientes a diferentes rutas biosintéticas responden a la inducción por MeJa en un rango temporal similar.

Por otro lado, los valores de expresión en tejido fértil muestran una tendencia uniforme durante el desarrollo del cistocarpo: no se encontraron diferencias significativas en los valores de expresión para el gen *MYB* ni para los genes de estrés cuando se compararon las muestras tratadas con MeJa a las 24 h y 48 h respectivamente (Tabla 9).

Sin embargo, *GiODC* revela un patrón opuesto con un máximo de expresión a las 48 h coincidiendo con el mayor grado de desarrollo de los cistocarpos (Tabla 9).

En plantas superiores, donde el conocimiento es más extenso en comparación con algas, los mecanismos por los cuales los vegetales perciben los jasmonatos y como dicha percepción afecta la regulación transcripcional, a día de hoy no han sido completamente dilucidados (Seo *et al.*, 2001). Consecuentemente, establecer qué vía de señalización es responsable de la respuesta en algas rojas es meramente especulativo.

No obstante, de nuestros resultados podemos inferir que *ODC* es capaz de percibir MeJa, integrar la señal y generar una respuesta a nivel génico, la cual afectará el desarrollo y maduración del cistocarpo.

En tejido fertilizado, el gen *GiODC* cuyo máximo de expresión ocurre a las 24 h ( $1,87 \pm 0,15$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y decrece hasta un estado basal a las 48 h ( $1,12 \pm 0,06$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$ ), se comporta como un gen de respuesta rápida, capaz de modificar su capacidad transcripcional en un periodo relativamente corto (rango de horas), en respuesta a un estímulo de crecimiento y/o desarrollo, en este caso la inducción por MeJa.

En este sentido, los resultados observados muestran un patrón diferencial: por un lado, una rápida acumulación de transcritos generada por la inducción con MeJa en talos fertilizados la cual no presenta un cambio fisiológico aparente (no se observa una acumulación o maduración de cistocarpos significativa en el tejido); mientras que en talos fértiles, la activación de *GiODC* provoca la maduración y apertura de los cistocarpos.

Así en talos fértiles la expresión de *GiODC* se incrementa desde unos valores iniciales de  $0,75 \pm 0,03$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$  a las 24 h hasta alcanzar su máximo a las 48 h posteriores al estímulo ( $1,11 \pm 0,04$  copias  $\mu\text{L}^{-1}$ ), coincidiendo con la presencia de cistocarpos. De igual forma, estos resultados fueron observados previamente para tejido infértil (Montero-Fernández *et al.*, 2016), donde la aplicación exógena con MeJa inducía la maduración y aparición de los cistocarpos a las 48 h, mostrando por un lado la capacidad para percibir dicha molécula y a la vez generar una respuesta acorde, y por otro lado, la necesidad de un periodo de transición desde la



percepción del estímulo (periodo de inducción o *elicitation period*) hasta la manifestación visible de la respuesta generada (periodo de aparición de los cistocarpos o *disclosure period*).

En relación a esto, se plantea la pregunta de si la expresión de *GiODC* es regulada principalmente por MeJa o es el estado de maduración del tejido el que determina los niveles de expresión del gen.

Debido a que visualmente es imposible distinguir fases de desarrollo intermedias más allá de las determinadas en este trabajo, es difícil establecer un momento temporal específico en el cual dicha señal finalmente actúe afectando el tejido. Sin embargo, podríamos suponer la posibilidad de que el tejido de *Grateloupia* sometido a tratamiento con MeJa, fuese 'diferente', o capaz de comportarse de manera diferencial en función del momento en que percibe la señal. Así tendríamos una respuesta en el incremento de transcritos rápida, desde el momento en que aplicamos el tratamiento hasta las primeras 24 h, y por otro lado tendríamos una respuesta espacial, a las 48 h, con el cistocarpo completamente maduro en el cual se puede llegar a producir la apertura del mismo.

Sin embargo y aunque el trabajo aquí presentado supone un primer acercamiento a nivel general sobre el comportamiento de diversos genes conformando parte de la intrincada red molecular existente en algas rojas y asociados al proceso reproductivo tras la inducción con dos compuestos volátiles, etileno y metil jasmonato, sienta las bases para futuros estudios sobre la importancia de estas sustancias y su implicación en el proceso de carpoesporogénesis en algas rojas.

## Conclusiones

### Objetivo 1

- En este capítulo el efecto del compuesto inductor de naturaleza volátil etileno sobre la expresión génica ha sido evaluado en tejido fertilizado y fértil de la macroalga roja *G. imbricata*. Para ello, 8 genes asociados con diferentes aspectos fisiológicos e involucrados en diversas rutas biosintéticas han sido evaluados. Los genes estudiados se relacionan con la ruta de respuesta y síntesis del ET (*ACS* y *SAMs*); ruta biosintética de las poliaminas (*GiODC*, *AAO*, *SAMs* y *Spds*), y estrés oxidativo (*WD40*, *citocromo P450* y *APX*).
- La metodología empleada para la cuantificación de la expresión ha sido la técnica de amplificación digital por gotas (ddPCR o *droplet digital PCR*), la cual permite una cuantificación absoluta sin la necesidad de establecer controles internos o *house-keeping genes*.
- El etileno presenta capacidad reguladora a nivel transcripcional afectando la expresión de los genes evaluados de manera significativa en comparación con las muestras sin tratar.
- La expresión es superior a las 24 h posteriores al tratamiento para la mayoría de los genes evaluados, lo que muestra una respuesta rápida ante la señal del ET, evidenciando la presencia de un sistema de percepción e integración de la señal en *G. imbricata*.
- Los genes que comparten rutas biosintéticas muestran comportamiento génico similar: así, aquellos involucrados en las rutas biosintéticas del etileno (*ACS* y *SAMs*) y las poliaminas (*GiODC*, *Spds*, *AAO* y *SAMs*) presentan perfiles de expresión similares, lo que sugiere interconexión entre ambas vías y regulación coordinada mediada por etileno. Por otro lado, los genes relacionados con estrés oxidativo (*citocromo P450* y *APX*) presentan mayor expresión en el momento coincidente con la aparición del cistocarpo, lo que se ha relacionado con el propio proceso de formación de la estructura reproductora y con una posible respuesta paliativa ante el estrés generado por la ocurrencia de dicho evento.
- Los niveles de expresión a lo largo del tiempo (24 h, 48 h y 168 h) al comparar talos fértiles y fertilizados tras tratamiento con ET no muestran diferencias significativas, a excepción de *ODC* y *citocromo P450*, lo que sugiere que en este caso, el grado de desarrollo no es determinante para la recepción e integración del estímulo.

## Objetivo 2

- En este capítulo el efecto del compuesto inductor de naturaleza volátil metil jasmonato (MeJa) sobre la expresión génica ha sido evaluado en tejido fertilizado y fértil de la macroalga roja *G. imbricata*. Para ello, se han seleccionado 5 genes, en adición a *GiODC*, presumiblemente asociados con diferentes aspectos del metabolismo de los jasmonatos en algas. Los genes estudiados se incluyen en la ruta de síntesis del MeJa (*JMT* y *MT*); respuesta a estrés (*WD40* y *citocromo P450*) y *MYB*, implicado en diferentes aspectos de la fisiología vegetal.
- Los resultados obtenidos muestran sobreexpresión de los genes en tejidos tratados.
- La inducción por MeJa genera un máximo de acumulación de transcritos a las 24 h en material fertilizado para todos los genes evaluados.
- En tejido fértil tratado con MeJa, la tendencia general mostrada es uniforme para todos los genes, a excepción de *GiODC*, el cual muestra un claro incremento de transcritos a las 48 h posteriores al tratamiento, momento coincidente con el grado máximo de maduración de las estructuras reproductoras.
- El máximo de expresión mostrado por *GiODC* a las 48 h tras tratamiento con MeJa, indica por un lado, que existe de manera clara una señal inductora de dicho volátil sobre el gen *ODC* y por otro lado, una respuesta relacionado con la maduración de las estructuras reproductoras.

## Bibliografía

- Abeles, F.B. 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press. New York, USA.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. y Saltveit, M.E. Jr. 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic. 2nd Ed.pp: 414. San Diego. California.
- Abrahamsson, K., Ekdahl, A., Collén, J., Fahlström, E. y Pedersén, M. 1995. The natural formation of trichlorethylene and perchloroethylene in sea water. En *Naturally-produced organohalogenes*. Ed: Grimvall, A. y Leer, W.B. Springer Science+Business Media, B.V.pp: 327-331.
- Adams, D.O. y Yang, S.F. 1977. Methionine metabolism in apple tissue implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol.* Vol. 60: 892-896.
- Adamski, N.M., Anastasiou, E., Eriksson, S., O'Neill, C.M. y Lenhard, M. 2009. Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 106: 20115-20120.
- Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Iwahashi, H. y Rakwal, R. 2003. Importance of ascorbate peroxidases *OsAPX1* and *OsAPX2* in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene.* Vol. 322: 93-103.
- Al-Attala, M.N., Wang, X., Abou-Attia, M.A., Duan, X. y Kang, Z. 2014. A novel TaMYB4 transcription factor involved in the defence response against *Puccinia striiformis* f. sp. tritici and abiotic stresses. *Plant Mol. Biol.* Vol. 84(4-5): 589-603.
- Alcolombri, U., Ben-Dor, S., Feldmesser, E., Levin, Y., Tawfik, D.S. y Vardi, A. 2015. MARINE SULFUR CYCLE. Identification of the algal dimethyl sulfide-releasing enzyme: A missing link in the marine sulfur cycle. *Science.* Vol. 348(6242):1466-1469.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R. y Yadav, R. C. 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* Vol. 19 (3): 307-321.
- Amsler, C. D. 2008. Algal Chemical Ecology. Springer. USA.
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J.R. y Guo, H. 2010. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *Plant Cell.* Vol. 22: 2384-2401.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnstrom, A., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Gobel, C., Feussner, I., y Ellerstrom, M. 2006. Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytydienoic acid containing galactolipid, arabidopside E. *J. Biol. Chem.* Vol. 281: 31528-31537.

- Apel, K. y Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* Vol. 5: 373-399.
- Arnold, T.M., Targett, N.M., Tanner, C.E. y Hatch, W.I. 2001. Evidence for methyl jasmonate induced phlorotannin production in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *J. Phycol.* Vol. 37: 1026-1029.
- Avanci, N.C., Luche, D.D., Goldman, G.H. y Goldman, M.H. 2010. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet. Mol. Res.* Vol. 9: 484-505.
- Ball, S.M., Hollingsworth, A.M., Humbles, J., Leblanc, C., Potin, P. y McFiggans, G. 2010. Spectroscopic studies of molecular iodine emitted into the gas phase by seaweed. *Atmos. Chem. Phys.* Vol. 10: 6237-6254.
- Bankova, V., Stepanov, K., Dimitrova-Konaklieva, S.T., Keremedchieva, G., Frette, X., Nikolova, C., Kujimgiev, A. y Popov, S. 2001. Secondary metabolites in *Chara globulares* Thuill. *Hydrobiologia.* Vol. 457: 199-203.
- Beale, M.H. y Ward, J.L. 1998. Jasmonates: key players in the plant defence. *Nat. Prod. Rep.* Vol. 15(6): 533-548.
- Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* Vol. 272: 20313-20316.
- Bouarab, K., Adas, F., Gaquerel, E., Kloareg, B., Salaün, J-P. y Potin, P. 2004. The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiol.* Vol. 135(3): 1838-1848.
- Boughton, A.J., Hoover, K. y Felton, G.W. 2005. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J. Chem. Ecol.* Vol. 31(9): 2211-2216.
- Brands, A. y Ho, T-H.D. 2002. Function of a plant stress-induced gene, *HVA22*. Synthetic enhancement screen with its yeast homolog reveals its role in vesicular traffic. *Plant Physiol.* Vol. 130(3): 1121-1131.
- Bravo-Linares, C.M., Mudge, S.M. y Loyola-Sepulveda, R.H. 2010. Production of volatile organic compounds (VOCs) by temperate macroalgae. The use of solid phase microextraction (spme) coupled to GC-MS as method of analysis. *J. Chil. Chem. Soc.* Vol. 55(2): 227-232.
- Broadgate, W.J., Malin, G., Kupper, F.C., Thompson, A. y Liss P.S. 2004. Isoprene and other non-methane hydrocarbons from seaweeds: a source of reactive hydrocarbons to the atmosphere. *Mar. Chem.* Vol. 88: 61-73.
- Browse, J. 2005. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Vitam. Horm.* Vol. 72: 431-456.

- Burreson, B.J., Moore, R.E. y Roller, P.P. 1976. Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). J. Agr. Food Chem. Vol. 24(4): 856-861.
- Cabrita, M.T., Vale, C. y Rauter, A.P. 2010. Halogenated compounds from marine algae. Mar. Drugs. Vol. 8(8): 2301-2317.
- Caron, F. 1990. Production of volatile sulfides from freshwater algae and implications to the environment. Tesis Doctoral. Universidad McMaster. Ontario. USA.
- Carol, R.J. y Dolan, L. 2006. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. J. Exp. Bot. Vol. 57: 1829-1834.
- Carpenter, L.J. y Liss, P.S. 2000. On temperate sources of bromoform and other reactive organic bromine gases. J. Geoph. Res. Vol. 105(D16): 20539-20547.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F. y Margis-Pinheiro, M. 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Gent. Mol. Biol. Vol. 35(4): 1011-1019.
- Chance, R., Baker, A.R., Küpper, F.C., Hughes, C., Kloareg, B. y Malin, G. 2009. Release and transformations of inorganic iodine by marine macroalgae. Estuar. Coast. Shelf Sci. Vol. 82: 406-414.
- Charlson, R.J., Lovelock, J.E., Andreae, M.O. y Warren, S.G. 1987. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. Nature. Vol. 326: 655-661.
- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H.M., Cheng, Z., Xie, D. y Peng, J. 2009. Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of *MYB21*, *MYB24*, and *MYB57* to promote stamen filament growth in Arabidopsis. PLOS Genet. Vol. 5(3): e1000440.
- Christov, C., Pouneva, I., Bozhkova, M., Toncheva, T., Fournadzieva, S. y Zafirova, T. 2001. Influence of temperature and methyl jasmonate on *Scenedesmus incrassulatus*. Biol. Plantarum. Vol. 44(3): 367-371.
- Chung, H.S., Koo, A.J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D. y Howe, G.A. 2008. Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. Plant Physiol. Vol. 146: 952-964.
- Cin, V.D., Danesin, M., Boschetti, A., Dorigoni, A. y Ramina, A. 2005. Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borck). J. Exp. Bot. Vol. 56(421): 2995-3005.
- Cock, J.M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A.E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artigue-nave, F., Aury, J.-M., Badger, J.H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet, E., Bothwell, J.H., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C.J., Charrier, B., Cho, G.Y., Coelho, S.M., Collén, J., Corre, E., Da Silva, C., Delage, L., Delaroque, N., Dittami, S.M., Doubeau, S., Elias, M., Farnham,

G., Gachon, G.M.M., Gschloessl, B., Heesch, S., Jabbari, K., Jubin, C., Kawai, H., Kimura, K., Kloareg, B., Küpper, F.C., Lang, D., Le Bail, A., Leblanc, C., Lerouge, P., Lohr, M., Lopez, P.J., Martens, C., Maumus, F., Michel, G., Miranda-Saavedra, D., Morales, J., Moreau, H., Motomura, T., Nagasato, C., Napoli, C.A., Nelson, D.R., Nyvall-Collén, P., Peters, A.F., Pommier, C., Potin, P., Poulain, J., Quesneville, H., Read, B., Rensing, S.A., Ritter, A., Rousvoal, S., Samanta, M., Samson, G., Schroeder, D.C., Ségurens, B., Strittmatter, M., Tonon, T., Tregear, J.W., Valentin, K., von Dassow, P., Yamagishi, T., Van de Peer, Y. y Wincker, P. 2010. The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. Vol. 465: 617-621.

Cole, K.M. y Sheath, R.G. 1990. *Biology of the red algae*. Cambridge University Press. New York.

Collén, J., Porcel, B., Carré, W., Ball, S.G., Chaparro, C., Tonon, T., Barbeyron, T., Michel, G., Noel, B., Valentin, K., Elias, M., Artiguenave, F., Arun, A., Aury, J.M., Barbosa-Neto, J.F., Bothwell, J.H., Bouget, F.Y., Brillet, L., Cabello-Hurtado, F., Capella-Gutiérrez, S., Charrier, B., Cladière, L., Cock, J.M., Coelho, S.M., Colleoni, C., Czjzek, M., Da Silva, C., Delage, L., Denoeud, F., Deschamps, P., Dittami, S.M., Gabaldón, T., Gachon, C.M., Groisillier, A., Hervé, C., Jabbari, K., Katinka, M., Kloareg, B., Kowalczyk, N., Labadie, K., Leblanc, C., Lopez, P.J., McLachlan, D.H., Meslet-Cladière, L., Moustafa, A., Nehr, Z., Nyvall Collén, P., Panaud, O., Partensky, F., Poulain, J., Rensing, S.A., Rousvoal, S., Samson, G., Symeonidi, A., Weissenbach, J., Zambounis, A., Wincker, P. y Boyen, C. 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 26: 5247-5252.

Creelman, R.A. y Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* Vol. 48: 355-381.

Czerpak, R., Piotrowska, A. y Szulecka, K. 2006. Jasmonic acid affects changes in the growth and some components content in alga *Chlorella vulgaris*. *Acta Physiol. Plant.* Vol. 28: 195-203.

Danon, A., Miersch, O., Felix, G., op den Camp, R.G.L. y Apel, K. 2005. Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* Vol. 41: 68-80.

Depuydt, S. y Hardtke, C.S. 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* Vol. 21(9): 365-373.

Dicke, M. y van Loon, J.J.A. 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.* Vol. 97: 237-249.

Dicke, M. y Loreto, F. 2010. Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends Plant Sci.* Vol. 15(3): 115-117.

Dudareva, N., Pichersky, E. y Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* Vol. 135: 1893-1902.

Duursma, E.K. y Dawson, R. 1981. En *Marine organic chemistry*. Ed: Duursma, E.K. y Dawson, R. Elsevier Ocean. Ser. The Netherlands.

Ellis, C. y Turner, J.G. 2001. The Arabidopsis mutant cev1 has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*. Vol. 13(5): 1025-1033.

Fernández-Barbero, G. 2015. Represión de la respuesta a Jasmonatos: el complejo JAZ/NIN-JA/TOPLESS. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Fernández Calvo, P. 2011. Identificación de nuevas dianas de los represores JAZ y caracterización de su papel en la activación de respuestas a la fitohormona jasmonato en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. y Turner, J.G. 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*. Vol. 6: 751-759.

Fink, P., von Elert, E. y Jüttner, F. 2006a. Volatile foraging kairomones in the littoral zone: Attraction of an herbivorous freshwater gastropod to algal odors. *J. Chem. Ecol.* Vol. 32: 1867-1881.

Fink, P., von Elert, E. y Jüttner, F. 2006b. Oxylipins from freshwater diatoms act as attractants for a benthic herbivore. *Arch. Hydrobiol.* Vol. 167:561-574.

Fujioka, S. y Yokota, T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 54: 137-164.

García-Jiménez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C. y Robaina, R.R. 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). *J. Plant Physiol.* Vol. 166: 1745-1754.

García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2012. Effects of ethylene on tetrasporogenesis in *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 48: 710-715.

García-Jiménez, P., Brito-Romano, O. y Robaina, R.R. 2013. Production of volatiles by the red seaweed *Gelidium arbuscula* (Rhodophyta): emission of ethylene and dimethylsulfide. *J. Phycol.* Vol. 49: 661-669.

García-Jiménez, P., Brito-Romano, O. y Robaina, R.R. 2016. Occurrence of jasmonates during cystocarp development in the red alga *Grateloupia imbricata*. *J. Phycol.* Vol. 52(6): 1085-1093.

Genovese, G., Tedone, L., Hamann, M.T. y Morabito, M. 2009. The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: A source of compounds against Leishmania. *Mar. Vol.* 7: 361-366.

Gocal, G.F.W., Sheldon, C.C. y Gubler, F. 2001. GAMyb-like gene, flowering and gibberellins signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* Vol. 127: 682-1691.



- Golemić, E., Tokarz, K., Wielanek, M. y Niewiadomska, E. 2014. A dissection of the effects of ethylene, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and high irradiance on antioxidants and several genes associated with stress and senescence in tobacco leaves. *J. Plant Physiol.* Vol. 171(3-4): 269-275.
- Gong, B., Li, X., VandenLangenberg, K.M., Wen, D., Sun, S., Wei, M., Li, Y., Yang, F., Shi, Q. y Wang, X. 2014. Overexpression of S-adenosyl-L-methionine synthetase increased tomato tolerance to alkali stress through polyamine metabolism. *Plant Biotechnol. J.* Vol. 12: 694-708.
- Gong, A-D., Li, H-P., Shen, L., Zhang, J-B., Wu, A-B., He, W-J., Yuan, Q-S., He, J-D. y Liao, Y-C. 2015. The *Shewanella* algae strain YM8 produces volatiles with strong inhibition activity against *Aspergillus* pathogens and aflatoxins. *Front. Microbiol.* Vol. 6: 1091.
- Guo, H. y Ecker, J.R. 2007. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 7: 40-49.
- Hamberg, M. 1992. Metabolism of 6,9,12-octadecatrienoic acid in the red alga *Lithothamnion corallioides*: mechanism of formation of a conjugated tetraene fatty acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 188: 1220-1227.
- Hamberg, M. y Gerwick, W.H. 1993. Biosynthesis of vicinal dihydroxy fatty acids in the red alga *Gracilaria lemaneiformis*: identification of a sodium dependent 12-lipoxygenase and a hydroperoxide isomerase. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 305: 115-122.
- Harborne, J.B. 1988. *Introduction to Ecological Biochemistry*. 3rd ed. Academic press. United Kingdom.
- Harper, M.K., Bugni, T.S., Copp, B.R., James, R.D., Lindsay, B.S., Richardson, A.D., Schnabel, P.C., Tasdemir, D., VanWagoner, R.M., Verbitzki, S.M. y Ireland, C.M. 2001. *Introduction to the chemical ecology of marine natural products*. Ed: McClintock, J.B. y Baker, B.J. USA.
- Higginson, T., Li, S.F. y Parish, R.W. 2003. AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* Vol. 35: 177-192.
- Howe, G.A. y Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 59: 41-66.
- Hu, X., Zhang, Y., Shi, Y., Zhang, Z., Zou, Z., Zhang, H. y Zhao, J. 2012. Effect of exogenous spermidine on polyamine content and metabolism in tomato exposed to salinity-alkalinity mixed stress. *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 57: 200-209.
- Ianora, A., Boersma, M., Casotti, R., Fontana, A., Harder, J., Hoffmann, F., Pavia, H., Potin, P., Poulet, S.A. y Toth, G. 2006. New trends in marine chemical ecology. *Estuar. Coast.* Vol. 29(4): 531-551.
- Ikawa, M., Sasner, J.J. y Haney, J.F. 2001. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia.* Vol. 443(1): 19-22.

- Jüttner, F., Höflacher, B. y Wurster, K. 1986. Seasonal analysis of volatile organic biogenic substances (vobs) in freshwater phytoplankton populations dominated by Dinobryon, Microcystis and Aphanizomenon. *J. Phycol.* Vol. 22(2): 169-175.
- Jüttner, F. 1995. Physiology and biochemistry of odorous compounds from fresh-water cyanobacteria and algae. *Water Sci. Technol.* Vol. 31: 69-78.
- Jüttner, F. 2005. Evidence that polyunsaturated aldehydes of diatoms are repellents for pelagic crustacean grazers. *Aquat. Ecol.* Vol. 39: 271-282.
- Kang, J.H., Wang, L., Giri, A. y Baldwin, I.T. 2006. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *Plant Cell.* Vol. 18(11): 3303-3320.
- Kiene, R.P., Visscher, P., Keller, M. y Kirst, G.O. 1996. Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds. Plenum Press. New York.
- Kim, J., Smith, J.J., Tian, L. y Dellapenna, D. 2009. The evolution and function of carotenoid hydroxylases in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* Vol. 50: 463-479.
- Kitajima, S., Ueda, M., Sano, S., Miyake, C., Kohchi, T., Tomizawa, K., Shigeoka, S. y Yokota, A. 2002. Stable form of ascorbate peroxidase from the red alga *Galdieria partita* similar to both chloroplastic and cytosolic isoforms of higher plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol. 66(11): 2367-2375.
- Klick, S. y Abrahamsson, K. 1992. Biogenic volatile iodated hydrocarbons in the ocean. *J. Geoph. Res.* Vol. 97(C8): 12683-12687.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L. y Bergstrom, L.G. 1993. Floral scents: a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry.* Vol. 33: 253-280.
- Krochko, J.E., Abrams, G.D., Loewen, M.K., Abrams, S.R. y Cutler, A.J. 1998. Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol.* Vol. 118: 849-860.
- Krupina, M.V. y Dathe, W. 1991. Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Z. Naturforsch.* Vol. 46c: 1127-1129.
- Kumari, P., Reddy, C.R.K. y Jha, B. 2015. Methyl jasmonate-induced lipidomic and biochemical alterations in the intertidal macroalga *Gracilaria dura* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Plant Cell Physiol.* Vol. 56(10): 1877-1889.
- 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., III, W.L., Kroneck, P.M.H., Meyer-Klaucke, W. y Feitersm, M.C. 2008. Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 105(19): 6954-6958.

- Küpper, F.C., Gaquerel, E., Cosse, A., Adas, F., Peters, A.F., Müller, D.G., Kloareg, B., Salaün, J.P. y Potin, P. 2009. Free fatty acids and methyl jasmonate trigger defense reactions in *Laminaria digitata*. *Plant Cell Physiol.* Vol. 50(4): 789-800.
- Lerdau, M., Guenther, A. y Monson, R. 1997. Plant production and emission of volatile organic compounds. *Bioscience.* Vol. 47(6): 373-383.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano, R. 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell.* Vol. 15: 165-178.
- Lee, S., Lee, J., Paek, K.-H., Kwon, S.-Y., Cho, H.S., Kim, S.J. y Park, J.M. 2010. A novel WD40 protein, BnSWD1, is involved in salt stress in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol. Rep.* Vol. 4: 165-172.
- Leedham, E.C., Hughes, C., Keng, F.S.L., Phang, S.-M., Malin, G. y Sturges, W.T. 2013. Emission of atmospherically significant halocarbons by naturally occurring and farmed tropical macroalgae. *Biogeosciences.* Vol. 10: 3615-3633.
- Leedham, E.C., Phang, S.M., Sturges, W.T. y Malin, G. 2015. The effect of desiccation on the emission of volatile bromocarbons from two common temperate macroalgae. *Biogeosciences.* Vol. 12: 387-398.
- Lepesheva, G.I. y Waterman, M.R. 2004. CYP51: the omnipotent P450. *Mol. Cell Endocrinol.* Vol. 215(1-2): 165-170.
- Liao, W., Yang, Y., Li, Y., Wang, G. y Peng, M. 2016. Genome-wide identification of cassava R2R3 MYB family genes related to abscission zone separation after environmental stress-induced abscission. *Sci. Rep.* Vol. 6: 32006.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M. y Perata, P. 2013. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol.* Vol. 199: 639-649.
- Liszakay, A., van der Zalm, E. y Schopfer, P. 2004. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , and  $OH^{\cdot}$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol.* Vol. 136: 3114-3123.
- Liss, P.S., Malin, G., Turner, S.M. y Holligan, P.M. 1994. Dimethyl sulphide and Phaeocystis: a review. *J. Mar. Syst.* Vol. 5: 41-53.
- Liu, Q.Y. y Reith, M.E. 1994. Isolation of a gametophyte-specific cDNA encoding a lipoxygenase from the red alga *Porphyra purpurea*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* Vol. 3: 206-209.
- Liu, J. y Zhu, J.K. 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* Vol. 114(2): 591-596.

- Liu, M., Hansen, P.E. y Lin, X. 2011. Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Mar. Drugs*. Vol. 9(7): 1273-1292.
- Loreto, F. y Schnitzler, J.P. 2010. Abiotic stress and induced BVOCS. *Trends Plant Sci*. Vol. 15: 154-166.
- Lorrain, S., Vailliau, F., Balagué, C. y Roby, D. 2003. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci*. Vol. 8: 263-271.
- Lovelock, J.E., Maggs, C. y Rasmussen, R. 1972. Atmospheric dimethyl sulfide and the natural sulfur cycle. *Nature*. Vol. 237: 452-453.
- Ma, M., Wang, Q., Li, Z., Cheng, H., Li, Z., Liu, X., Song, W., Appels, R. y Zhao, H. 2015. Expression of *TaCYP78A3*, a gene encoding cytochrome P450 CYP78A3 protein in wheat (*Triticum aestivum* L.), affects seed size. *Plant J*. Vol. 83: 312-325.
- Machado, R.A.R., McClure, M., Hervé, M.R., Baldwin, I.T. y Erb, M. 2016. Benefits of jasmonate-dependent defenses against vertebrate herbivores in nature. Vol. 5: e13720.
- Maksup, S., Roytrakul, S. y Supaibulwatana, K. 2014. Physiological and comparative proteomic analyses of Thai jasmine rice and two check cultivars in response to drought stress. *J. Plant Interact*. Vol. 9(1): 43-55.
- Malin, G. 1997. Sulphur, climate and the microbial maze. *Nature*. Vol. 387: 857-859.
- Malin, G. y Kirst, G.O. 1997. Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role. *J. Phycol*. Vol. 33: 889-896.
- Mandaokar, A. y Browse, J. 2009. MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol*. Vol. 149: 851-862.
- Mandaokar, A., Kumar, V.D., Amway, M. y Browse, J. 2003. Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development. *Plant Mol. Biol*. Vol. 52: 775-786.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B.M., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G. y Browse, J. 2006. Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. *Plant J*. Vol. 46: 984-1008.
- Manley, S. 1992. Laboratory production of bromoform, methylene bromide, and methyl iodide by macroalgae and distribution in nearshore southern California waters. *Limnol. Oceanogr*. Vol. 37(8): 1652-1659.
- Marián, F.D. 2002. Mixotrofia y actividad biosintética de ácidos grasos e interacción poliamidas-glicerol durante el crecimiento y desarrollo de macroalgas marinas *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Marín-Loaida, J.C. y Céspedes, C.L. 2007. Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications. *Rev. Fitotec. Mex*. Vol. 30(4): 327-351.

- Matamoros, M.A., Dalton, D.A., Ramos, J., Clemente, M.R., Rubio, M.C. y Becana, M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol.* Vol. 133: 499-509.
- Materic, D., Bruhn, D., Turner, C., Morgan, G., Mason, N. y Gauci, V. 2015 Methods in plant foliar volatile organic compounds research. *Appl. Plant Sci.* Vol. 3(12): 1500044.
- Miller, G., Shulaev, V. y Mittler, R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* Vol. 133(3): 481-489.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* Vol. 33: 453-467.
- Mishra, A.K., Muthamilarasan, M., Khan, Y., Parida, S.K. y Prasad, M. 2014. Genome-wide investigation and expression analyses of WD40 protein family in the model plant Foxtail Millet (*Setaria italica* L.). *PLOS ONE.* Vol. 9(1): e86852.
- Mithoo-Singh, P.K., Keng, F.S-L., Phang, S.M., Leedham, E.C., Sturges, W.T., Malin, G. y Abd Rahman, N. 2017. Halocarbon emissions by selected tropical seaweeds: species-specific and compound-specific responses under changing pH. *Peer J.* Vol. 5: e2918.
- Mittler, R. y Rizhsky, L. 2000. Transgene-induced lesion mimic. *Plant Mol. Biol.* Vol. 44: 335-344.
- Montero-Fernández, M., Robaina, R.R. y García-Jiménez, P. 2016. *In silico* characterization of DNA motifs associated with the differential expression of the ornithine decarboxylase gene during *in vitro* cystocarp development in the red seaweed *Grateloupia imbricata*. *J. Plant Physiol.* Vol. 195: 31-38.
- Mori, K. 1999. Miscellaneous natural products, including marine natural products, pheromones, plant hormones and aspects of ecology. En *Comprehensive natural products chemistry*. Ed: Barton, D. y Nakanishi, K. Elsevier. Vol. 8. pp: 748. United Kingdom.
- Mtolera, M.S.P., Collén, J., Pedersén, M., Ekdahl, A., Abrahamsson, K. y Semesi, A.K. 1996. Stress-induced production of volatile halogenated organic compounds in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensities. *Eur. J. Phycol.* Vol. 32(1): 89-95.
- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. y Murata, Y. 2007. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol.* Vol. 143: 1398-1407.
- Naznin, H.A., Kiyohara, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M. y Hyakumachi, M. 2014. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE.* Vol. 9(1): e86882.
- Niki, T., Kunugi, M. y Otsuki, A. 2000. DMSP-lyase activity in five marine phytoplankton species: its potential importance in DMS production. *Mar. Biol.* Vol. 136: 759-64.

- Niinemets, U., Loreto, F. y Reichstein, M. 2004. Physiological and physico-chemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends Plant Sci.* Vol. 9: 180-186.
- Noctor, G. y Foyer, C.H. 1998. Ascorbate glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 49: 249-279.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H. Jr. y Kangasjärvi, J. 2000. Ozone-sensitive Arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell.* Vol. 12: 1849-1862.
- Owen, M.S. y Peñuelas, J. 2005. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends Plant Sci.* Vol. 10: 420-426.
- Paré, P.W. y Tumlinson, J.H. 1997. *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiol.* Vol. 114: 1161-1167.
- Paré, P.W., Farag, M.A., Krishnamachari, V., Zhang, H., Ryu, C.M. y Kloepper, J.W. 2005 Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynthesis Res.* Vol. 85: 149-159.
- Pascual, L., Blanca, J.M., Cañizares, J. y Nuez, F. 2009. Transcriptomic analysis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin synthesis during pat3/pat4 parthenocarpic fruit set. *BMC Plant Biol.* Vol. 9: 67.
- Pasdaran, A., Hamedí, A. y Mamedov, N. 2016. Antibacterial and insecticidal activity of volatile compounds of three algae species of Oman Sea. *Int. J. Sec. Metabolite.* Vol. 3(2): 66-73.
- Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., Inze, D. y Goossens, A. 2008. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 105: 1380-1385.
- Pauwels, L., Inze, D. y Goossens, A. 2009. Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci.* Vol. 14: 87-91.
- Pauwels, L. y Goossens, A. 2011. The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell.* Vol. 23: 3089-3100.
- Peñuelas, J. y Llusà, J. 2004. Plant VOC emissions: making use of the unavoidable. *Trends Ecol. Evol.* Vol. 9: 402-404.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Métraux, J.P. y Broekaert, W.F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell.* Vol. 10(12): 2103-2113.
- Pilati, S., Brazzale, D., Guella, G., Milli, A., Ruberti, C., Biasioli, F., Zottini, M. y Moser, C. 2014. The onset of grapevine berry ripening is characterized by ROS accumulation and lipoxygenase-mediated membrane peroxidation in the skin. *BMC Plant Biol.* Vol. 14: 87.

- Pinot, F. y Beisson, F. 2011. Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS J.* Vol. 278: 195-205.
- Plettner, I., Steinke, M. y Malin, G. 2005. Ethene (ethylene) production in the marine macroalga *Ulva* (*Enteromorpha*) *intestinalis* L. (Chlorophyta, Ulvophyceae): effect of light-stress and co-production with dimetil sulphide. *Plant Cell. Environm.* Vol. 28: 1136-1145.
- Pohnert, G., Lumineau, O., Cueff, A., Adolph, S., Cordevant, C., Lange, M. y Poulet, S. 2002. Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defence against copepods?. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 245: 33-45.
- Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., Gleba, D., Jenkins, I.S., Halpern, B.T., Kneer, R., Cragg, G.M. y Raskin, I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.* Vol. 46: 2542-2547.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse C.M.J. y Memelink, J. 2008. The AP2/ERF transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defence. *Plant Physiol.* Vol. 147(3): 1347-1357.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C. y Xie, D. 2011. The jasmonate-zim-domain proteins interact with the WD-repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* Vol. 23(5): 1798-1814.
- Radhika, V., Kost, C., Mithöfer, A. y Boland, W. 2010. Regulation of extrafloral nectar secretion by jasmonates in lima bean is light dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Vol. 107(40): 17228-17233.
- Ramanjulu, S. y Bartels, D. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* Vol. 25: 141-151.
- Reed, R.H. 1983. Measurement and osmotic significance of beta dimethylsulfonylpropionate in marine macroalgae. *Mar. Biol. Lett.* Vol. 4: 173-181.
- Reeves, P.H., Ellis, C.M., Ploense, S.E., Wu, M-F., Yadav, V., Tholl, D., Chételat, A., Haupt, I., Kennerley, B.J., Hodgens, C., Farmer, E.E., Nagpal, P. y Reed, J.W. 2012. A regulatory network for coordinated flower maturation. *PLOS Genet.* Vol. 8(2): e1002506.
- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I. y Reinbothe, S. 2009. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J.* Vol. 276: 4666-4681.
- Rezanka, T., Zahradník, J. y Podojil, M. 1982. Hydrocarbons in green and blue-green algae. *Folia Microbiol (Praha).* Vol. 27(6): 450-454.
- Roje, S. 2006. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry.* Vol. 67: 1686-1698.

- Rosenstiel, T.N., Ebbets, A.L., Khatri, W.C., Fall, R. y Monson, R.K. 2004. Induction of poplar leaf nitrate reductase: a test of extrachloroplastic control of isoprene emission rate. *Plant Biol.* Vol. 6: 12-21.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D. y Jacquot, J.P. 2008. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 59: 143-166.
- Sacramento, A.T., García-Jiménez, P., Alcázar, R., Tiburcio, A.F. y Robaina, R.R. 2004. Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 40: 887-894.
- Sacramento, A.T., García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2007. Spermine induces cystocarp development in marine alga. *Plant Growth Regul.* Vol. 53: 147-154.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K. y Mizutani, M. 2004. Arabidopsis CYP707as encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol.* Vol. 134: 1439-1449.
- Saiz-López, A., Plane, J.M.C., Baker, A.R., Carpenter, L.J., von Glasow, R., Martín, J.C.G., McFiggans, G. y Saunders, R.W. 2012. Atmospheric chemistry of iodine. *Chem. Rev.* Vol. 112: 1773-1804.
- Sano, S., Ueda, M., Kitajima, S., Takeda, T., Shigeoka, S., Kurano, N., Miyachi, S., Miyake, C. y Yokota, A. 2001. Characterization of ascorbate peroxidases from unicellular red alga *Galdieria partita*. *Plant Cell Physiol.* Vol. 42(4): 433-440.
- Santelices, B., Bolton, J. y Meneses, I. 2009. Marine algal communities. En *Marine Macroecology*. Ed: Witman, J.D. y Roy, K. The University of Chicago Press. pp: 153-194. Chicago.
- Sawicki, M., Barka, E.A., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N. y Jacquard, C. 2015. Cross-talk between environmental stresses and plant metabolism during reproductive organ abscission. *J. Exp. Bot.* Vol. 66(7): 1707-1719.
- Schall, C., Laturnus, F. y Heumann, G. 1994. Biogenic volatile organoiodine and organobromine compounds released from polar macroalgae. *Chemosphere.* Vol. 28(7): 1315-1324.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. y Lewinsohn, E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* Vol. 54: 712-732.
- Seitz, K., Buxmann, J., Pöhler, D., Sommer, T., Tschritter, J., Neary, T., O'Dowd, C., y Platt, U. 2010. The spatial distribution of the reactive iodine species IO from simultaneous active and passive DOAS observations. *Atmos. Chem. Phys.* Vol. 10: 2117-2128.
- Seo, S.H., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee Y-H., Lee, Y-W., Hwang, I., Lee, J.S. y Choi, Y.D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *PNAS.* Vol. 98(8): 4788-4793.



- Shin, B., Choi, G., Yi, H., Yang, S., Cho, I., Kim, J., Lee, S., Paek, N.C., Kim, J.H., Song, P.S. y Choi, G. 2002. AtMYB21, a gene encoding a flower specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J.* Vol. 30: 23-32.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G. y Mittler, R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plantarum.* Vol. 132: 1998-1208.
- Simó, R. 2001. Production of atmospheric sulfur by oceanic plankton: biochemical, ecological, and evolutionary links. *Trends Ecol. Evol.* Vol. 16: 287-294.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., y Xie, D. 2011. The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Vol. 23(3): 1000-1013.
- Sotelo-Silveira, M., Cucinotta, M., Chauvin, A-L., Montes, R.A.C., Colombo, L., Marsch-Martínez, N. y de Folter, S. 2013. Cytochrome P450 CYP78A9 is involved in *Arabidopsis* reproductive development. *Plant Physiol.* Vol. 162: 779-799.
- Spinelli, F., Cellini, A., Marchetti, L., Mudigere, K. y Piovene, C. 2011. Emission and function of volatile organic compounds in response to abiotic stress. En *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. Ed: Shanker, A. y Venkateswarlu, B. InTech.
- Steiner-Lange, S., Unte, U.S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z.A., Schmelzer, E., Dekker, K. y Saedler, H. 2003. Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant J.* Vol. 34: 519-528.
- Steinke, M. y Kirst, G.O. 1996. Enzymatic cleavage of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in cell-free extracts of the marine macroalga *Enteromorpha clathrata* (Roth) Grev. (Ulinales, Chlorophyta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 201: 73-85.
- Steinke, M., Wolfe, G.V. y Kirst, G.O. 1998. Partial characterisation of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyase isozymes in 6 strains of *Emiliania huxleyii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 175: 215-225.
- Steinke, M., Malin, G. y Liss, P. 2002. Trophic interactions in the sea: an ecological role for climate relevant volatiles. *J. Phycol.* Vol. 38:630-638.
- Suhita, D., Kolla, V.A., Vavasseur, A. y Raghavendra, A.S. 2003. Different signaling pathways involved during the suppression of stomatal opening by methyl jasmonate or abscisic acid. *Plant Sci.* Vol. 164: 481-488.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M. y Vavasseur, A. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.* Vol. 134(4): 1536-1545.

Sun, M-S., Chung, G-H. y Shin, T-S. 2012. Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*. J. App. Phycol. Vol. 24: 1003-1013.

Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J. y Morley, A.A. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. Biotechniques. Vol. 13(3): 444-449.

Tomás-Barberán, F.A., Loiza-Velarde, J., Bonfanti, A. y Saltveit, M.E. 1997. Early wound- and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. J. Am. Soc. Hortic. Sci. Vol. 122: 399-404.

Uji, T., Matsuda, R., Takechi, K., Takano, H., Mizuta, H. y Takio, S. 2016. Ethylene regulation of sexual reproduction in the marine red alga *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). J. Appl. Phycol. Vol. 28: 3501-3509.

Van Alstyne, K.L., Wolfe, G.V., Freidenburg, T.L., Neill, A. y Hicken, C. 2001. Activated defense systems in marine macroalgae: evidence for an ecological role for DMSP cleavage. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 213: 53-65.

Van Alstyne, K.L. 2008. Ecological and physiological roles of dimethylsulfoniopropionate and its products in marine macroalgae. En *Algal Chemical Ecology*. Capítulo 8. Springer. USA.

Van Zhong, G. y Burns, J.K. 2003. Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. Plant Mol. Biol. Vol. 53: 117-131.

Vanden Driessche, Th., Kevers, V. y Collet, M. 1988. *Acetabularia mediterranea* and ethylene: production in relation with development, circadian rhythms in emission, and response to external application. J. Plant Physiol. Vol. 133(5): 635-639.

Vick, B.A. y Zimmerman, D.C. 1983. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 111(22): 470-477.

Vriezen, W.H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J. y Mariani, C. 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. New Phytol. Vol. 77: 60-76.

Vuorinen, T., Reddy, G.V.P., Nerg, A.M. y Holopainen, J.K. 2004. Monoterpene and herbivore-induced emissions from cabbage plants grown at elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. Atmos. Environ. Vol. 38: 675-682.

Wang, P., Zhang, B., Li, X., Xu, C., Yin, X., Shan, L., Ferguson, I. y Chen, K. 2010. Ethylene signal transduction elements involved in chilling injury in non-climacteric loquat fruit. J. Exp. Bot. Vol. 61(1): 179-190.

- Watanabe, T. y Kondo, N. 1976. Ethylene evolution in marine algae and a proteinaceous inhibitor of ethylene biosynthesis from red alga. *Plant Cell Physiol.* Vol. 17: 1159-1166.
- Watanabe, H., Kende, H., Hayakawa, T. y Saigusa, M. 2008. Cloning of a cytochrome P450 gene induced by ethylene treatment in deepwater rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* Vol. 11(1): 124-126.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* Vol. 100: 681-697.
- Weinberger, F., Lion, U., Delage, L., Kloareg, B., Potin, P., Beltrán, J., Flores, V., Faugeron, S., Correa, J. y Pohnert, G. 2011. Up-regulation of lipoxygenase, phospholipase, and oxylipin-production in the induced chemical defense of the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. *J. Chem. Ecol.* Vol. 37: 677-686.
- Wiesemeier, T., Jahn, K. y Pohnert, G. 2008. No evidence for the induction of brown algal chemical defense by the phytohormones jasmonic acid and methyl jasmonate. *J. Chem. Ecol.* Vol. 34(12): 1523-1531.
- Wiens, J.A., Cates, R.G., Rotenberry, J.T., Cobb, N., Van Horne, B. y Redak, R.A. 1991. Arthropod dynamics on sagebrush (*Artemisia tridentata*): effects of plant chemistry and avian predation. *Ecol. Monogr.* Vol. 61: 299-322.
- Woodger, F.J., Gubler, F., Pogson, B.J. y Jacobsen, J.V. 2003. A MAK-like kinase is a repressor of GAMYB in barley aleurone. *Plant J.* Vol. 33: 707-717.
- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell.* Vol. 6(8): 1077-1085.
- Xu, C. y Min, J. 2011. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell.* Vol. 2(3): 202-214.
- Xu, J. y Zhang, S. 2015. Ethylene biosynthesis and regulation in plants. En *Ethylene in plants*. Ed: Wen, C-K. Springer.pp: 1-25. Berlin.
- Yamamoto, M., Baldermann, S., Yoshikawa, K., Fujita, A., Mase, N. y Watanabe, N. 2014. Determination of volatile compounds in four commercial samples of japanese green algae using solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry. *Sci. World J.:* 289780.
- Yan, C. y Xie, D. 2015. Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotechnol. J.* Vol. 13: 1233-1240.

- Yan, Y., Borrego, E. y Kolomiets, M.V. 2013. Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses. En *Lipid metabolism*. Ed: Baez, R.V. InTech. DOI: 10.5772/2928.
- Yoch, D.C., Ansele, J.H. y Rabinowitz, S. 1997. Evidence for intracellular and extracellular dimethylsulfopropionate (DMSP) lyases and DMSP uptake sites in two species of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 63: 3182-3188.
- Yoch, D.C. 2002. Dimethylsulfoniopropionate: its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68: 5804-5815.
- Yordanova, Z.P., Iakimova, E.T., Cristescu, S.M., Harren, F.J., Kapchina-Toteva, V.M. y Woltering, E.J. 2010 Involvement of ethylene and nitric oxide in cell death in mastoparan-treated unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Biol. Int.* Vol. 34(3): 301-308.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J. y Okada, K. 2009. Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in Arabidopsis. *Development.* Vol. 136: 1039-1048.
- Youngblood, W.W. y Blumer, M. 1973. Alkanes and alkenes in marine benthic algae. *Marine Biol.* Vol. 21(3): 163-172.
- Zhang, Y. y Turner, J.G. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLOS ONE.* Vol. 3(11): e3699.
- Zhao, N., Yao, J., Chaiprasongsuk, M., Li, G., Guan, J., Tschaplinski, T.J., Guo, H. y Chen, F. 2013. Molecular and biochemical characterization of the jasmonic acid methyltransferase gene from black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Phytochemistry.* Vol. 94: 74-81.
- Zuo, Z., Zhu, Y., Bai, Y. y Wang, Y. 2012. Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 51: 175-184.



# CONCLUSIONES GENERALES



## Conclusiones Generales

- El estudio y análisis *in silico* de la región 5' del gen *ODC* en la macroalga roja *Grateloupia imbricata* (*GiODC*) ha permitido la identificación de diversos motivos y elementos reguladores contenidos en la misma.
- De los elementos identificados, seis de ellos se relacionan con respuestas al crecimiento y desarrollo de *G. imbricata* como son el fotoperiodo (PIFs y Dof), el etileno (SMZ, RAV y Abi4) y el metil jasmonato (MYCs).
- Los resultados de expresión diferencial del gen de la ornitina descarboxilasa revelan la importancia del tipo de inductor (luz, etileno, metil jasmonato) y del tiempo de desarrollo *in vitro* del cistocarpo (*elicitation period vs disclosure period*).
- El etileno afecta la expresión de diversos genes relacionados con las rutas biosintéticas del mismo (*ACC sintasa* y *SAM sintasa*); las poliaminas (*GiODC*, *AAO*, *SAM sintasa* y *espermidina sintasa* (*Spds*)) y la respuesta ante estrés oxidativo (*APX*, *citocromo P450* y *WD40*).
- Considerando la sobreexpresión del gen codificante para la enzima SAM sintasa, en talos fertilizados y fértiles, se puede decir que las rutas de síntesis de poliaminas y etileno trabajan en sinergia.
- La sobreexpresión del gen *Spd sintasa* a medida que los cistocarpos se desarrollan y maduran corrobora la necesidad de las poliaminas espermidina y espermina en la formación y aparición de las estructuras reproductoras.
- La sobreexpresión en tejido fertilizado para todos los genes implicados en la ruta de síntesis del metil jasmonato (*Jasmonic-Acid Methyl-Transferase* (*JMT*) y *Methyl-Transferase* (*MT*)), respuesta a estrés (*WD40* y *citocromo P450*) y *MYB* tras el tratamiento con metil jasmonato, revela una inducción generalizada de transcritos por acción de este inductor.
- Por el contrario, en talos fértiles únicamente la expresión de *GiODC* se ve alterada, lo que señala un comportamiento específico del metil jasmonato durante la maduración de los cistocarpos.
- La respuesta mostrada por *GiODC* para todos los tratamientos de inducción del evento reproductivo y los diferentes estados de desarrollo de los cistocarpos, confirman su importancia como gen candidato durante el proceso de carposporogénesis.







# BIBLIOGRAFÍA GENERAL



## Bibliografía general

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A. y Ibraheem, I.B.M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* Vol. 19: 257-275.
- Anand, N., Rachel, D., Thangaraju, N. y Anantharaman, P. 2016. Potential of marine algae (seaweeds) as source of medicinally important compounds. *Plant Gen. Res.* Vol. 14(4): 303-313.
- Ausín, I., Alonso-Blanco, C. y Martínez-Zapater, J-M. 2005. Environmental regulation of flowering. *Int. J. Dev. Biol.* Vol. 49: 689-705.
- Barbier, G., Oesterhelt, C., Larson, M.D., Halgren, R.G., Wilkerson, C., Garavito, R.M., Benning, C. y Weber, A.P.M. 2005. Unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiol.* Vol. 137: 460-474.
- Baweja, P., Sahoo, D., García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2009. Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: problems, achievements and prospects. *Phycol. Res.* Vol. 57: 45-58.
- Beale, M.H. y Ward, J.L. 1998. Jasmonates: key players in the plant defence. *Nat. Prod. Rep.* Vol. 15(6): 533-548.
- Bhattacharya, D., Price, D.C., Chan, C.X., Qiu, H., Rose, N., Ball, S., Weber, A.P.M., Arias, M.C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Krishnan, A., Zaüner, S., Morath, S., Hilliou, F., Egizi, A., Perri-neau, M-M. y Yoon, H.S. 2013. Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nat. Commun.* Vol. 4: 1941.
- Blanc, G., Duncan, G., Fkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Polle, J., Salamov, A., Terry, A., Yamada, T., Dunigan, D.D., Grigoriev, I.V., Claverie, J-M. y Van Etten, J.L. 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell.* Vol. 22: 2943-2955.
- Blanc, G., Agarkova, I., Grimwood, J., Kuo, A., Brueggeman, A., Dunigan, D.D., Gurnon, J., Ladunga, I., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Pröschold, T., Salamov, A., Schmutz, J., Weeks, D., Yamada, T., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Claverie, J-M., Grigoriev, I-V. y Van Etten, J.L. 2012. The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Gen. Biol.* Vol. 13: R39.
- Castine, S.A., McKinnon, A.D., Paul, N.A., Trott, L.A. y de Nys, R. 2013. Wastewater treatment for land-based aquaculture: improvements and value-adding alternatives in model systems from Australia. *Aquacult. Environ. Interact.* Vol. 4: 285-300.

Chan, C-X., Ho, C-L. y Phang, S-M. 2006. Trends in seaweed research. Trends Plant Sci. Vol. 11(4): 165-166.

Chan, C.X., Blouin, N.A., Zhuang, Y., Zäuner, S., Prochnik, S.E., Lindquist, E., Lin, S., Benning, C., Lohr, M., Yarish, C., Gantt, E., Grossman, A.R., Lu, S., Müller, K., Stiller, J.W., Brawley, S.H. y Bhattacharya, D. 2012. Porphyra (Bangiophyceae) transcriptomes provide insights into red algal development and metabolism. J. Phycol. Vol. 48: 1328-1342.

Cock, J.M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A.E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artigue-nave, F., Aury, J-M., Badger, J.H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet, E., Bothwell, J.H., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C.J., Charrier, B., Cho, G.Y., Coelho, S.M., Collén, J., Corre, E., Da Silva, C., Delage, L., Delaroque, N., Dittami, S.M., Doubeau, S., Elias, M., Farnham, G., Gachon, G.M.M., Gschloessl, B., Heesch, S., Jabbari, K., Jubin, C., Kawai, H., Kimura, K., Kloareg, B., Kupper, F.C., Lang, D., Le Bail, A., Leblanc, C., Lerouge, P., Lohr, M., Lopez, P.J., Martens, C., Maumus, F., Michel, G., Miranda-Saavedra, D., Morales, J., Moreau, H., Motomura, T., Nagasato, C., Napoli, C.A., Nelson, D.R., Nyvall-Collén, P., Peters, A.F., Pommier, C., Potin, P., Poulain, J., Quesneville, H., Read, B., Rensing, S.A., Ritter, A., Rousvoal, S., Samanta, M., Samson, G., Schroeder, D.C., Ségurens, B., Strittmatter, M., Tonon, T., Tregear, J.W., Valentin, K., von Dassow, P., Yamagishi, T., Van de Peer, Y. y Wincker, P. 2010. The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. Nature. Vol. 465: 617-621.

Cole, K.M. y Sheath, R.G. 1990. Biology of the red algae. Cambridge University Press. New York.

Collén, J., Porcel, B., Carré, W., Ball, S.G., Chaparro, C., Tonon, T., Barbeyron, T., Michel, G., Noel, B., Valentin, K., Elias, M., Artigue-nave, F., Aruri, A., Aury, J.M., Barbosa-Neto, J.F., Bothwell, J.H., Bouget, F.Y., Brillet, L., Cabello- Hurtado, F., Capella-Gutiérrez, S., Charrier, B., Cladière, L., Cock, J.M., Coelho, S.M., Colleoni, C., Czejek, M., Da Silva, C., Delage, L., Denoed, F., Deschamps, P., Dittami, S.M., Gabaldón, T., Gachon, C.M., Groisillier, A., Hervé, C., Jabbari, K., Katinka, M., Kloareg, B., Kowalczyk, N., Labadie, K., Leblanc, C., Lopez, P.J., McLachlan, D.H., Meslet-Cladière, L., Moustafa, A., Nehr, Z., Nyvall Collén, P., Panaud, O., Partensky, F., Poulain, J., Rensing, S.A., Rousvoal, S., Samson, G., Symeonidi, A., Weissenbach, J., Zambounis, A., Wincker, P. y Boyen, C. 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 110: 5247-5252.

Corkill, G. y Rapley, R. 2008. The manipulation of nucleic acid: basic tools and techniques. En *Molecular Biomethods Handbook*. Ed: Walker, J.M. y Rapley, R. 2nd Ed. Human Press. pp:3-15.

DePriest, M.S., Bhattacharya, D. y López-Bautista, J.M. 2013. The plastid genome of the red macroalga *Grateloupia taiwanensis* (Halymeniaceae). PLOS ONE. Vol. 8(7): e68246.

Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A.Z., Robbins, S., Partensky, F., Degroove, S., Echeynié, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O.,

- Piégu, B., Ball, S. G., Ral, J.-P., Bouget, F.-Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y. y Moreau, H. 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *PNAS*. Vol. 103(31): 11647-11652.
- Fernández-Barbero, G. 2015. Represión de la respuesta a Jasmonatos: el complejo JAZ/NIN-JA/TOPLESS. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Fernández Calvo, P. 2011. Identificación de nuevas dianas de los represores JAZ y caracterización de su papel en la activación de respuestas a la fitohormona jasmonato en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.
- Gabrielson, P.W. y Garbary, D.J. 1985. Systematics of red algae (Rhodophyta). *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* Vol. 3: 325-366.
- García-Jiménez, P. 1994. Aclimatación reproductiva fisiológica y estructural al cultivo *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.
- García-Jiménez, P., Rodrigo, M. y Robaina, R.R. 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *J. App. Phycol.* Vol. 10(1): 95-100.
- García-Jiménez, P., Geraldino, P.J.L., Boo, S.M. y Robaina, R.R. 2008. Red alga *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae), a species introduced into the Canary Islands. *Phycol. Res.* Vol. 56: 166-171.
- García-Jiménez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C. y Robaina, R.R. 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). *J. Plant Physiol.* Vol. 166: 1745-1754.
- García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2012. Effects of ethylene on tetrasporogenesis in *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 48: 710-715.
- García-Jiménez, P., Brito-Romano, O. y Robaina, R.R. 2013. Production of volatiles by the red seaweed *Gelidium arbuscula* (Rhodophyta): emission of ethylene and dimethylsulfide. *J. Phycol.* Vol. 49: 661-669.
- García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2015. On reproduction in red algae: further research needed at the molecular level. *Front. Plant Sci.* Vol. 6: 93.
- García-Jiménez, P., Brito-Romano, O. y Robaina, R.R. 2016. Occurrence of jasmonates during cystocarp development in the red alga *Grateloupia imbricata*. *J. Phycol.* Vol. 52: 1085-1093.
- García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2017. Volatiles in the aquatic marine ecosystem: ethylene and related plant hormones and sporulation in red seaweeds. En *Systems Biology of Marine Ecosystems*. Ed: Kumar, M. Springer. *En prensa*.

- Grossman, A.R., Harris, E.E., Hauser, C., Lefebvre, P.A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C.D., Stern, D., Vallon, O. y Zhang, Z. 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryot. Cell.* Vol. 2(6): 1137-1150.
- Guiry, M.D. 2012. How many species of algae are there? *J. Phycol.* Vol. 48: 1057-1063.
- Guzmán-Urióstegui, A., Robledo, D. y Robaina, R.R. 2002. Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 38: 1169-1175.
- Haug, A. y Jensen, A. 1954. Seasonal variation in the chemical composition of *Alaria esculenta*, *Laminaria saccharina*, *Laminaria hyperborea* and *Laminaria digitata* from Northern Norway. Akademisk Trykningssentral.
- Hommersand, M.H. y Fredericq, S. 1990. En *Biology of the red algae*. Ed: Cole, K.M. y Sheath, R.G. Cambridge University Press. New York.
- Huala, E. y Sussex, I.M. 1993. Determination and cell interactions in reproductive meristems. *Plant Cell.* Vol. 5: 1157-1165.
- Hurd, C.L., Harrison, P.J., Bischof, K. y Lobban, C.S. 2014. En *Seaweed Ecology and Physiology*. Second Ed. Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom.
- Jensen, A. 1956. Component sugars of some common brown algae. Akademisk Trykningssentral. Rep. 9. Norwegian Institute of Seaweed Research. Blindern. Oslo.
- Kraan, S. 2012. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. En *Carbohydrates. Comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology*. Ed: Chang, C-F. InTech, DOI: 10.5772/51572.
- Kumar, C.S., Ganesan, P. y Bhaskar, N. 2008. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem.* Vol. 107(2): 707-713.
- Lawson, E.J.R. y Poethig, R.S. 1995. Shoot development in plants: time for a change. *Trends Genet.* Vol. 11: 263-268.
- Lee, J.I, Kim, H.G., Geraldino, P.L.J., Hwang, I.K. y Boo, S.M. 2009. Molecular classification of the genus *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Korea. *Algae.* Vol. 24: 231-238.
- Lin, S.-M., Liang, H.Y. y Hommersand, M.H. 2008. Two types of auxiliary cell ampullae in *Grateloupia* (Halymeniaceae) including *G. taiwanensis* sp. nov. and *G. orientalis* sp. nov. from Taiwan based on rbcL gene sequence analysis and cystocarp development. *J. Phycol.* Vol. 44: 196-214.
- Lin, H. y Qin, S. 2014. Tipping points in seaweed genetic engineering: scaling up opportunities in the next decade. *Mar. Drugs.* Vol. 12(5): 3025-3045.
- Marston, M. y Villalard-Bohnsack, M. 2002. Genetic variability and potential sources of *Grate-*



*Ioupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island waters (USA). *J. Phycol.* Vol. 38: 649-658.

Mateo-Cid, L.E., Mendoza-Gonzales, A.C., Gavio, B. y Fredericq, S. 2005. *Grateloupia huertana* sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta), a peculiar new prostrate species from tropical Pacific Mexico. *Phycologia*. Vol. 44: 4-16.

Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-i, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y. y Kuroiwa, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*. Vol. 428: 653-657.

McDaniel, C.N., Singer, S.R. y Smith, S.M.E. 1992. Developmental states associated with the floral transition. *Dev. Biol.* Vol. 153: 59-69.

Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L-K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L-H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M.H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C-L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Ferris, P., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J. V., Moseley, J. *et al.* 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. Vol. 318(5848): 245-250.

Mikami, K. 2013. Current advances in seaweed transformation. En *An integrated view of the molecular recognition and toxicology. From analytical procedures to biomedical applications*. Ed: Baptista, G.R. InTech. Rijeka, Croacia. pp: 323-347.

Milledge, J.J., Smith, B. Dyer, P.W. y Harvey, P. 2014. Macroalgae-derived biofuel: a review of methods of energy extraction from seaweed biomass. *Energies*. Vol. 7: 7194-7222.

Miyagishima, S-Y. y Nakanishi, H. 2010. The chloroplast division machinery: origin and evolution. En *Red algae in the genomic age*. Ed: Seckbach, J. y Chapman, D. Springer. Dordrecht Heidelberg London New York.

Montero-Fernández, M., Robaina, R.R. y García-Jiménez, P. 2016. *In silico* characterization of DNA motifs associated with the differential expression of the ornithine decarboxylase gene during *in vitro* cystocarp development in the red seaweed *Grateloupia imbricata*. *J. Plant Physiol.* Vol. 195: 31-38.

Moreau, H., Verhelst, B., Couloux, A., Derelle, E., Rombauts, S., Grimsley, N., Van Bel, M., Poulain, J., Katinka, M., Hohmann-Marriott, M. F., Piganeau, G., Rouzé, P., Da Silva, C., Wincker, P., Van de Peer, Y. y Vandepoele, K. 2012. Gene functionalities and genome structure in *Bathycoccus prasinos* reflect cellular specializations at the base of the green lineage. *Genome Biol.* Vol.13: R74.

Mouradov, A., Cremer, F. y Coupland, G. 2002. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell.* S111-S130.

Murata, M. y Nakazoe, J. 2001. Production and use of marine algae in Japan. *Jarq Jpn. Agr. Res. Q.* Vol. 35(4): 281-290.

Murray, M.G. y Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* Vol. 8 (19).

Nakamura, Y., Sasaki, N., Kobayashi, M., Ojima, N., Yasuike, M., Shigenobu, Y., Satomi, M., Fukuma, Y., Shiwaku, K., Tsujimoto, A., Kobayashi, T., Nakayama, I., Ito, F., Nakajima, K., Sano, M., Wada, T., Kuhara, S., Inouye, K., Gojobori, T. y Ikeo, K. 2013. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, Susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). *PLOS.* Vol. 8 (3): e57122.

Notoya, M. 2010. Production of biofuel by macroalgae with preservation of marine resources and environment. En *Seaweeds and their role in globally changing environments*. Ed: Israel, A., Eivav, R. y Seckbach, J. Springer. pp: 217-228. New York.

Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S.J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N. y Kuroiwa, T. 2007. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol.* Vol. 5: 28.

Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otilar, R., Merchant, S.S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., Vallon, O., Piganeau, O., Jancek, S., Heijde, M., Jabbari, K., Bowler, C., Lohr, M., Robbens, S., Werner, G., Dubchak, I., Pazour, G.J., Ren, Q., Paulsen, I., Delwiche, C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Van de Peer, Y., Moreau, H. y Grigoriev, I.V. 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *PNAS.* Vol. 104: 7705-7710.

Pérez-González, C-M. 2013. Caracterización biológica y química de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.

Prochnik, S.E., Umen, J., Nedelcu, A.M., Hallmann, A., Miller, S.M., Nishii, I., Ferris, P., Kuo, A., Mitros, T., Fritz-Laylin, L.K., Hellsten, U., Chapman, J., Simakov, O., Rensing, S.A., Terry, A., Pangilinan, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Salamov, A., Shapiro, H., Schmutz, J., Grimwood,



- J., Lindquist, E., Lucas, S., Grigoriev, I.V., Schmitt, R., Kirk, D. y Rokhsar, D.S. 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science*. Vol. 329(5988): 223-226.
- Qin, S., Lin, H. y Jiang, P. 2012. Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnol. Adv.* Vol. 30(6): 1602-1613.
- Robaina, R.R. 1988. Biotecnología del cultivo "in vitro" de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Rodrigo, M. 1998. Desarrollo en macroalgas: sustancias reguladoras, fotofisiología y diferenciación celular (tetrasporogénesis) durante los estadios de crecimiento *in vitro* del alga roja *Grateloupia doryphora*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Roje, S. 2006. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal group donor. *Phytochem.* Vol. 67: 1686-1698.
- Sacramento, A.T., García-Jiménez, P., Alcázar, R., Tiburcio, A.F. y Robaina, R.R. 2004. Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 40: 887-894.
- Sacramento, A.T., García-Jiménez, P. y Robaina, R.R. 2007. Spermine induces cystocarp development in marine alga. *Plant Growth Regul.* Vol. 53: 147-154.
- Schönknecht, G., Chen, W-H., Ternes, C.M., Barbier, G.G., Shrestha, R.P., Stanke, M., Bräutigam, A., Baker, B.J., Banfield, J.F., Garavito, R.M., Carr, K., Wilkerson, C., Rensing, S.A., Gagneul, D., Dickenson, N.E., Oesterhelt, C., Lercher, M.J. y Weber, A.P.M. 2013. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science*. Vol. 339(6124): 1207-1210.
- Shrager, J., Hauser, C., Chang, C-W., Harris, E.H., Davies, J., McDermott, J., Tamse, R., Zhang, Z. y Grossman, A. 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* Genome Project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol.* Vol. 131(2): 401-408.
- Singer, S.R., Hannon, C.H. y Huber, S.C. 1992. Acquisition of competence for floral determination in shoot apices of *Nicotiana*. *Planta*. Vol. 188: 546-550.
- Smith, D.R., Lee, R.W., Cushman, J.C., Magnuson, J.K., Tran, D. y Polle, J.E.W. 2010. The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. *BMC Plant Biol.* Vol. 10: 83.
- Sutherland, E.J., Lindstrom, S.C., Nelson, W.A., Brodie, J. y Lynch, D.J.M. 2011. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 47: 1131-1151.
- Thomas, N.V. y Kim, S-K. 2013. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmoceuticals. *Mar. Drugs*. Vol. 11(1): 146-164.

- Torres, F.A.E., Passalacqua, T.G., Velásquez, A.M.A., de Souza, R.A., Colepicolo, P. y Graminha, M.A.S. 2014. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Rev. Bras. Farmacogn.* Vol. 24: 265-276.
- Tsekos, I. 1981. Growth and differentiation of the Golgi apparatus and wall formation during carposporogenesis in the red alga *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *J. Cell Sci.* Vol. 52: 71-84.
- Tsekos, I. 1983. The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour: gonimoblast cells and carpospores. *Flora.* Vol. 174: 191-211.
- Tsekos, I. y Schnepf, E. 1983. The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour: auxiliary cells and cystocarpic plants. *Flora.* Vol. 173: 81-96.
- Turcios, A.E. y Papenbrock, J. 2014. Sustainable treatment of aquaculture effluents-what can we learn from the past for the future? *Sustainability.* Vol. 6: 836-856.
- Vadas, R.L., Johnson, S. y Norton, T.A. 1992. Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae. *Br. Phycol. J.* Vol. 27: 331-351.
- van Baren, M.J., Bachy, C., Reistetter, E.N., Purvine, S.O., Grimwood, J., Sudek, S., Yu, H., Poirier, C., Deerinck, T.J., Kuo, A., Grigoriev, I.V., Wong, C-H., Smith, R.D., Callister, S.J., Wei, C-L., Schmutz, J. y Worden, A.Z. 2016. Evidence-based green algal genomics reveals marine diversity and ancestral characteristics of land plants. *BMC Genomics.* Vol. 17: 267.
- Wetherbee, R. 1978. Differentiation and continuity of the Golgi apparatus during carposporogenesis in *Polysiphonia* (Rhodophyta). *Protoplasma.* Vol. 95: 347-360.
- Wetherbee, R. 1980. Postfertilization development in the red alga *Polysiphonia* I. Proliferation of the carposporophyte. *J. Ultrast. Res.* Vol. 70: 259-274.
- Yan, Y., Borrego, E. y Kolomiets, M.V. 2013. Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses. En *Lipid metabolism*. Ed: Baez, R.V. InTech. DOI: 10.5772/2928.
- Yanagisawa, M., Nakamura, K., Ariga, O. y Nakasaki, K. 2011. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process. Biochemistry.* Vol. 46(11): 2111-2116.
- Yang, M.Y. y Kim, M.S. 2015. Taxonomy of *Grateloupia* (Halymeniales, Rhodophyta) by DNA barcode marker analysis and a description of *Pachymeniopsis volvita* sp. nov. *J. Appl. Phycol.* Vol. 27: 1373-1384.
- Yoon, H.S., Müller, K.S., Sheath, R.G., Ott, F.D. y Bhattacharya, D. 2006. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *J. Phycol.* Vol. 42(2): 482-492.
- Yoon, H.S., Zuccarello, G.C. y Bhattacharya, D. 2010. Evolutionary history and taxonomy of red algae. En *Red algae in the genomic age*. Ed: Seckbach, J. y Chapman, D. Springer. Dordrecht Heidelberg London New York.

Zhao, N., Yao, J., Chaiprasongsuk, M., Li, G., Guan, J., Tschaplinski, T.J., Guo, H. y Chen, F. 2013. Molecular and biochemical characterization of the jasmonic acid methyltransferase gene from black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Phytochemistry*. Vol. 94: 74–81.





# ANEXO: PUBLICACIONES







Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Plant Physiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jplph](http://www.elsevier.com/locate/jplph)

## Physiology

# *In silico* characterization of DNA motifs associated with the differential expression of the ornithine decarboxylase gene during *in vitro* cystocarp development in the red seaweed *Grateloupia imbricata*



Montserrat Montero-Fernández, Rafael R. Robaina, Pilar Garcia-Jimenez\*

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad of Las Palmas de Gran Canaria, E-35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 November 2015  
 Received in revised form 5 March 2016  
 Accepted 6 March 2016  
 Available online 10 March 2016

## Keywords:

Cystocarp development  
 Ethylene  
 Gene expression  
 Methyl jasmonate  
 Ornithine decarboxylase gene  
 Red seaweed

## ABSTRACT

To gain a better understanding of the regulatory mechanism(s) modulating expression of the ornithine decarboxylase gene *ODC* during cystocarp development in the red seaweed *Grateloupia imbricata*, DNA motifs found in the 5'-upstream region of the gene were identified by *in silico* analysis. In addition, when infertile *G. imbricata* thalli were treated with ethylene, methyl jasmonate, or light as an elicitor of cystocarp development, different *ODC* expression patterns were observed. *ODC* expression correlated with (i) the elicitation (treatment) period and the period post-treatment just prior to observation of the first visible developing cystocarps (disclosure period), and (ii) the type of elicitor. Ethylene and light activated *ODC* expression during the elicitation period, and methyl jasmonate activated its expression during the disclosure period, suggesting that initiation and cystocarp development may involve more than one signaling pathway. In addition, expression of *ODC* was 450-fold greater when thalli were stimulated by ethylene compared with untreated control thalli, suggesting that *G. imbricata* mounts an efficient response to sense and activate ethylene-responsive signaling pathways. The patterns of differential *ODC* expression induced by the different elicitors during cystocarp development might provide an useful tool for characterizing the precise transcriptional regulation of *ODC* in *G. imbricata*.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## 1. Introduction

The formation of the reproductive structure, the cystocarp, in red seaweed involves the switch from the vegetative to the reproductive stage, and this transition is influenced by environmental stimuli such as the length of the day (photoperiod), light quality, temperature, and available nutrients (Cole and Sheath, 1990). In addition, endogenous factors, e.g., growth regulators, auxins, and cytokinins, but mainly polyamines and ethylene, affect the development and maturation of cystocarps (Chan et al., 2006; Baweja et al., 2009; Garcia-Jimenez et al., 2013). Indeed, endogenous levels of the polyamines putrescine, spermidine, and spermine affect *Grateloupia imbricata* and *Gracilaria cornea* cystocarp development and sporulation (Guzmain-Urióstegui et al., 2002; Sacramento et al., 2004, 2007). Recently, the gaseous hormone ethylene was shown to induce tetrasporogenesis by altering the putrescine level in the red seaweed *Pterocladia capillacea*

(Garcia-Jimenez and Robaina, 2012). Carposporogenesis has also been induced after treating *G. imbricata* thalli for 15 min with ethylene (Garcia-Jimenez and Robaina, 2012). The synthesis of putrescine is mediated by the enzyme ornithine decarboxylase (*ODC*, EC. 4.1.1.17; Sacramento et al., 2004). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) studies showed that the *G. imbricata ODC* (*GiODC*; GenBank accession number FJ223132) is differentially expressed in infertile and fertile thalli (Garcia-Jimenez et al., 2009). *In situ* hybridization confirmed that *GiODC* is not expressed in mature thalli that have visible cystocarps (Garcia-Jimenez et al., 2009). Therefore, *ODC* regulation appears to be crucial for the development of *G. imbricata* reproductive structures and therefore has a role in the reproduction of this organism.

The cellular *ODC* level is regulated transcriptionally, translationally, and by proteolytic degradation (Marton and Pegg, 1995; Hayashi et al., 1996). *In vitro*, the activity of a semi-purified *ODC* preparation from *G. imbricata* was inhibited by polyamines, most likely via proteolysis in proteasomes, with spermine affording the greatest inhibition (~90%; Sacramento et al., 2007). Conversely, transcriptional control is mediated by transcription factors (TFs), RNA polymerase and *cis*-acting elements

\* Corresponding author.

E-mail address: [pilar.garcia@ulpgc.es](mailto:pilar.garcia@ulpgc.es) (P. Garcia-Jimenez).

```
5'...GATGTTGGCAGGCTTTACCGCCTTCATCAGGTAAGGACTGTGTCTCTACGTCGCTGACTTGTGGC
AAGCAGTGCAGTGTGTCAACGTATAACAGGATGGCTGCCAACTATTTGTGGGTTCCAAGTG
CCTTGCTGTCTCTGCAGGCTTCTACTGAGAAAAATGCCACGAGTGAGGCCGTTTTACGCTGTA
AAGTGCAACCCGAGCCCTGTAATGCTGCGCTTCTGGCCAATTTAGGCTGTGGGTTCCAGACTG
TGCATCAGCAAAGGAAATGGCAACAGTCTAGACATGGGAGTTGAAGCGGAGTTCGATTG
TGTTCGCCCATCCATGCAAAACGCCCGTTGGATCTGGAGTTTGCAATTGAGACTAATGTTACG
GTACGTCTTGCTCGGTACAATCGCAGAACATCCTGTGCCTTTGCACGTGCGGGTCAATGCA
CTGACCACCAGAATATTGAGTACGTGTTGAAGATGTGTGTGTACAGCGGATGACATTTGA
CTGCGTGGATGAGCTGGAGAAGGTGGCAGCGGAGTGCCCGCATGCTGAGTTGGTGTCCGC
ATTAGGGCAGATGACCCCTTCTGCTGTTGTACAATTCGGCCACAAGTATGGAGCAGATCCGCA
GACGGAGGCTCTAT...3'
```

**Fig. 1.** Fragment of *GiODC* including the regions complementary to the primers used for PCR. Complementary sequences are highlighted in bold type for the first round of PCR and in bold italics and underlined for the second round.

located in the DNA as enhancers and silencers among others (Lang et al., 2010; Franco-Zorrilla et al., 2014). TFs directly enhance or repress transcription of their target genes (Riechmann, 2002; Riancho-Pachón et al., 2008; Lang et al., 2010), and consequently the type, location, and distribution of their regulatory motifs affect the efficiency of transcription. Characterization of these regulatory motifs contributes to our understanding of transcriptional regulation—for example how such elements influence *ODC* expression and, consequently, how they affect reproductive structure development in seaweed.

We hypothesized that TFs under the control of growth regulators and/or abiotic factors (e.g., light) might, in general, affect red seaweeds *ODC* expression. Therefore, the main objectives for the study reported herein were to sequence the *GiODC* 5'-upstream region by chromosome walking, to identify motifs contained within this region that might be involved in *G. imbricata* reproduction via *ODC* expression and to examine, using qRT-PCR, how *GiODC* expression varies when the seaweed is subjected to different experimental conditions known to affect the verified functions of motifs found within its 5'-upstream region.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

*G. imbricata* thalli were collected along the northeast coast of the Gran Canaria Island in the Canary Islands. Their cystocarps appear in female gametophytes as small, dark spots (<1 mm in diameter) and are completely embedded in the thalli. We visualized *G. imbricata* cystocarps under a stereomicroscope. Thus, infertile (without cystocarps) and fertile (with cystocarps) axes belonging to the same individual (i.e., anchored to the same basal structure) were easily distinguished. Within 2 h of collection, infertile axes (henceforth referred to as infertile thalli) were acclimatized in an aquarium containing 50 L of autoclaved seawater for 2 days at  $19 \pm 2^\circ\text{C}$  under a 16-h light/8-h dark photoperiod at  $50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 2.2. Chromosome walking to retrieve the *GiODC* 5'-upstream sequence

DNA was extracted from frozen *G. imbricata* tissue (100 mg) according to Murray and Thompson (1980) with modifications. In short, tissue was homogenized in liquid nitrogen and then incubated in 800  $\mu\text{L}$  of 100 mM Tris-HCl, pH 8, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0.1% (w/v), PVPP, 0.1% (w/v), SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol in a water bath at  $65^\circ\text{C}$  for 1 h. The following steps were all per-

formed at room temperature. Subsequently, an equal volume of chloroform/isoamyl alcohol solution (24:1 v/v) was added and, the sample was gently mixed by inversion at intervals of 20 s. The mixture was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm in a Beckman Coulter Allegra X-22R centrifuge (Beckman Coulter Inc. Brea, CA USA). The supernatant was washed twice with the chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v) solution, after which, the remaining volume in the tube was filled with *n*-propanol, and the contents mixed gently. Next, the mixture was centrifuged at 13,000 g for 30 min, and the pellet, containing genomic DNA, was washed with ethanol (80% v/v, molecular grade) and suspended in 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA.

Genomic DNA (~500 ng) was first digested with *XhoI* (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ , which was then inactivated at  $65^\circ\text{C}$  for 20 min. Next, the digested DNA was ligated with T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI, USA) as recommended by the supplier, and then the ligation products were purified using WizardSV Gel and PCR Clean-Up System reagents (Promega). Finally, a second digestion with *XbaI* was carried out (Triglia et al., 1988; Silver and Keerikatte, 1989), and the inactivation step was repeated. An aliquot of the digested DNA (5  $\mu\text{L}$ ) was amplified in a 50- $\mu\text{L}$  volume containing 2  $\mu\text{L}$  of the primers F1 and R1 (10 mM each; Table 1) and the following reagents from Takara Bio: 10  $\mu\text{L}$  5 $\times$  PrimeSTAR buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ), and 4  $\mu\text{L}$  of a dNTP mixture (2.5 mM each dNTP). Then, a second PCR was performed with primers F2 and R3 (Table 1) using 5  $\mu\text{L}$  of the first-round amplification product. This procedure was designed to amplify the region upstream of the 5' end of *GiODC* (Fig. 1). Both amplifications were performed in a MyCycler thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with an initial denaturation step at  $96^\circ\text{C}$  for 5 min followed by 38 cycles at  $94^\circ\text{C}$  for 1.5 min,  $45^\circ\text{C}$  for 1 min, and  $72^\circ\text{C}$  for 5 min, and a final elongation step at  $72^\circ\text{C}$  for 10 min. The second-round amplification product was electrophoresed through an agarose gel (1% w/v) at 75 V. The major amplification product was extracted and purified from the agarose gel using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System reagents. Sequencing was performed by Sistemas Genómicos (Valencia, Spain), and the resulting sequence was aligned to that of *GiODC* found in the GenBank database using EMBOSS Water software ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_water/nucleotide.html](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html)).

### 2.3. Characterization of *GiODC* 5'-upstream motifs

Nine databases (Table 2) were searched to identify TF-related motifs and regulatory sequences, which might affect *GiODC* expression and, possibly therefore, *G. imbricata* reproduction.



**Table 1**  
Sequences of the oligonucleotides used in this work.

Primers		Name	Sequence (5' – 3')	
PCR	1st round	F1	ATGGGAGTTGAAGCGGAGT	
		R1	ACTGTTGCCATTTCTTTGC	
	2nd round	F2	GCCCGTTGGATCTGGAGT	
		R3	CCACAAGTCAGCGACGTAGA	
Housekeeping <sup>a</sup>	F	GTLRS1 (Grateloupia Large RibosomalSub-unit1)	GGCTTTTGTAGTGGCTGATAATC	
			R	CACTCCGTCGTCCTCACC
	F	GTLRS2 (Grateloupia Large RibosomalSub-unit2)	GACCCGAAAGATGGTGAACATA	
			R	CTACGACCTCCACCAGAGT
	F	CCEF (Chondrus crispus Elongation Factor)	CACGGACTCTTACCATTACACC	
			R	CCAGTAATCATGTTCTTGATGA
	F	HPEF (Haematococcus Pluvialis Elongation Factor)	CACGTGACTCCGGTAAATC	
			R	GCTTGTGCATACCTCCCAAC
	Specific-ODC <sup>b</sup>	F	uplodc	AATGTGGTGGGTGTGTCCTT
		R	uplodc	TAGTGGGTAGGCATCACAGC

<sup>a</sup> Housekeeping genes for real-time PCR normalization.

<sup>b</sup> Specific-ODC primers for optimal real-time PCR.

**Table 2**  
Databases used to determine the transcriptional factors within the 5'-upstream region of the red seaweed *Grateloupia imbricata* and potential regulatory motifs involved in reproduction.

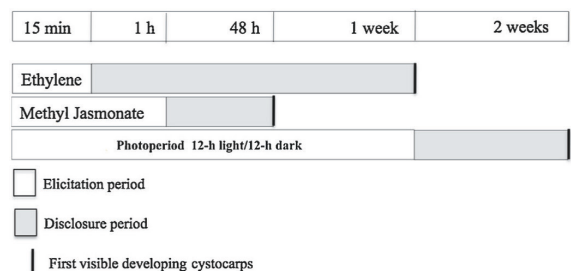
Databases	
MEME <a href="http://meme.nbcr.net/meme/">http://meme.nbcr.net/meme/</a>	A tool for discovering motifs in a group of related DNA or protein sequences
GOMO <a href="http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/gomo.cgi">http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/gomo.cgi</a>	Database that uses the DNA binding motifs to find putative target genes and analyze their associated GO terms
FEX: <a href="http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fex&amp;group=programs&amp;subgroup=gfind">http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fex&amp;group=programs&amp;subgroup=gfind</a>	Finding potential 5', internal and 3'-coding exons
GENEMARK <a href="http://exon.gatech.edu/GeneMark/">http://exon.gatech.edu/GeneMark/</a>	Gene structure predictor for the most-similar protein
JASPAR CORE Plantae <a href="http://jaspar.genereg.net/">http://jaspar.genereg.net/</a>	The JASPAR CORE database contains an accurated, non-redundant set of profiles, derived from published collections of experimentally defined transcription factor binding sites for eukaryotes
AmiGO <a href="http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi?action=advanced_query&amp;session_id=">http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi?action=advanced_query&amp;session_id=</a>	Gene Ontology database
The Eukaryotic Promoter <a href="http://epd.vital-it.ch/">http://epd.vital-it.ch/</a>	Database with an annotated non-redundant collection of eukaryotic POL II promoters for which the transcription start site has been determined experimentally
PLACE <a href="https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?sid=&amp;lang=en&amp;pj=640&amp;action=page&amp;page=newplace">https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?sid=&amp;lang=en&amp;pj=640&amp;action=page&amp;page=newplace</a>	Database of motifs found in plant cis-acting regulatory DNA elements
Consite <a href="http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite">http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite</a>	A tool to explore transcription factor binding sites shared by two genomic sequences

#### 2.4. Analysis of *GiODC* expression under different experimental conditions

The presence of motifs within the *GiODC* 5'-upstream region might suggest that the gene can be regulated by one or more TF. Because we could only observe the presence or absence of cystocarps, we established two benchmark times to determine if *GiODC* expression differed when exposed to an elicitor (ethylene, methyl jasmonate, or photoperiod) that favored reproduction. The first benchmark time was taken as the end of the elicitation period, i.e., immediately after a treatment, which coincided with the absence of reproductive structures. The second benchmark time, termed the disclosure time, coincided with the appearance of the first visible developing cystocarp (Fig. 2).

##### 2.4.1. RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen *G. imbricata* tissue (100 mg) using 1 mL Tri-Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA). Isolated RNA was suspended in 20  $\mu$ L of 1 M Tris-HCl, pH 8, 0.5 M EDTA and treated with DNase at a concentration of 1 U mg<sup>-1</sup> RNA (Promega) to eliminate contaminating DNA. Total RNA was quantified using a Beckman Coulter DU 530 spectrophotometer



**Fig. 2.** Schematic showing the timelines for the ethylene, methyl jasmonate, and the 12-h light/12-h dark, long-day photoperiod treatments of *G. imbricata* thalli. Upper bar, experimental time. Elicitation period (white bars), the period that an elicitor was applied and cystocarps were not present. Disclosure period (grey bar), time elapsed between the end of the elicitation period and when the cystocarps first appeared. Vertical-black lines indicate the time at which the developing cystocarps could first be visualized.

(Beckman Coulter) a  $\mu$ L-measurement cell. Next, RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed in the presence of oligo (dT) and random primers from the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Reverse tran-

scription was performed at 25 °C for 5 min, 42 °C for 30 min, and 85 °C for 5 min. The product was kept at 4 °C until used.

qRT-PCR was performed independently three times in a MiniOpticon thermal cycler (MJ Mini, Bio-Rad) using a volume of 25 µL that contained 12.5 µL SYBR Green Master Mix (Bio-Rad), 2.5 µL cDNA (from 1 mg total RNA), and 0.5 mL of ODC-specific primers (10 mM each; Table 1). This procedure produced an amplicon of 150 nt. Primer specificity and primer-dimer formation were monitored using a melting curve. The qRT-PCR protocol was initial denaturation at 95 °C for 2 min, then 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 30 s. *GiODC* expression was normalized to the synthesis of constitutively expressed (housekeeping) genes (Table 1) using GeNorm software as described by Vandesompele et al. (2002). Normalization comprises the selection of a set of genes that display minimal variation across the treatment, the determination of the geometric mean, and the normalization of the target gene(s) to this geometric mean (Vandesompele et al., 2009, 2002).

The housekeeping genes are reliably expressed (García-Jimenez et al., 2009). To follow the expression of these genes, we selected amplicons (~70 nt) from the conserved regions of the large ribosomal subunit RNAs of *Grateloupia turuturu* (Accession number, DQ364073), *Halymenia schizymenioides* (Accession number, DQ364067), and *Cryptomenia undulata* (Accession number, AF419133), and from the elongation factors of *Chondrus crispus* (Accession number, CO653259) and *Haematococcus pluvialis* (Accession number, DV203478) that were retrieved from the GenBank database.

#### 2.4.2. Effects of various photoperiods on *GiODC* expression

The effects of three photoperiods with different light/dark lengths on *GiODC* expression in thalli that were infertile at the start of the experiment were assessed. Three tufts, each containing 10 g of infertile thalli, were subjected to one of the following photoperiods: 12-h light/12-h dark (long day), 6-h light/18-h dark (short day), or 18-h light/6-h dark (control) for 1 week (end of elicitation period). After that, thalli were cultured for 2 weeks under an 18-h light/6-h dark cycle. At 2 weeks, cystocarps were first observed, (end of disclosure period), and then *GiODC* expression in the thalli was measured. For all photo-treatments, the thalli were irradiated with 500- to 650-nm light at 50 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and held at 20 °C.

#### 2.4.3. Effects of ethylene on *GiODC* expression

To test if ethylene affected *GiODC* expression, the acclimatized, infertile thalli, were placed into 500-mL vessels (3 g per vessel), each of which was sealed with an airtight lid that was taped to ensure a tight seal. The vessels had gas inlet and outlet ports and a flow meter attached. For the test samples, ethylene (99.9% purity; Carburos Metálicos SA, Barcelona, Spain) was introduced into the vessels for 15 min at 0.5 L min<sup>-1</sup>. Thalli was submerged in 200 mL of autoclaved seawater during ethylene treatment. Samples were immediately frozen (end of the elicitation period (t = 0)) or maintained in culture for 7 days in the taped vessels (end of the disclosure period (t = 7)). Acclimatized infertile thalli (at t = 0 and t = 7) that were not treated with ethylene served as controls. Thalli that was allowed to develop cystocarps were maintained in 200 mL of autoclaved seawater under an 18-h light/6-h dark photoperiod, after which *GiODC* expression was measured. To determine if *GiODC* expression was a consequence of exposure to ethylene, 4 mM silver thiosulfate (Sigma Co.), an inhibitor of ethylene perception, was added to some samples prior to ethylene treatment.

#### 2.4.4. Effect of methyl jasmonate on *GiODC* expression

Acclimated thalli (100 mg) were sprayed three times with 1 mL of 100 mM methyl jasmonate (Sigma Co.) in 0.01% (v/v) ethanol/autoclaved seawater at 1-min intervals and kept for 1 h under an 18-h light/6-h dark photoperiod. Then, thalli were rinsed

with autoclaved seawater and immediately frozen until RNA isolation or cultivated in autoclaved seawater-containing vessels for 48 h. Acclimated infertile thalli that had not been treated with methyl jasmonate and thalli first treated with phenidone (20 mM, Sigma Co.), an inhibitor of methyl jasmonate action, and then with methyl jasmonate as described above served as controls.

Phenidone reduces the *de novo* synthesis of methyl jasmonate but does not affect the methyl jasmonate concentration that already exists in the plants (Cucurou et al., 1991; Radhika et al., 2010).

#### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statgraphics Plus 3.1 for Windows (Statistical Graphics Co., Rockville, MA, USA). A 1-way ANOVA test was performed to determine differences in ODC gene expression between elicitor-treated and the corresponding control groups during the elicitation and disclosure periods. (p ≤ 0.05).

### 3. Results

#### 3.1. Chromosome walking to retrieve the *GiODC* 5'-upstream region and identify conserved motifs

One major amplification product of 602 nt that contained the ODC 5'-upstream region and a portion of its coding region was obtained. Local regions of this amplification product were then aligned with those of the *GiODC* sequence in the GenBank database using EMBOSS Water software, with the alignment showing partial overlaps of both sequences and with the amplification product showing an upstream sequence of 529 nt. We then searched the *GiODC* 5'-upstream region sequence for TF-related motifs (Table 3; Fig. 3). Each candidate motif was then classified into a specific family or subfamily according to information shown in Table 3. These motifs are known to be involved directly in transcription and/or transcriptional regulation and are mostly TF-related motifs that regulate diverse biological processes, e.g., response to light, stress, or hormone-network signaling (Table 3). We grouped these TF-related motifs into DNA-binding domain families as follows: those related to photoreceptors (basic Helix-Loop-Helix (bHLH), DNA-binding with One Finger (Dof)); ethylene response (APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF)); and jasmonate response (bHLH) (Riechmann, 2002; Heim et al., 2003; Lijavetzky et al., 2003; Saleh and Pagés, 2003; Boter et al., 2004; Moreno-Risueno et al., 2006; Giraud et al., 2009; Kagale et al., 2010; Niu et al., 2010; Schweizer et al., 2013). Other motifs identified correspond to those of the MYB (Myeloblastosis) family, whose members are implicated in responses to biotic and abiotic stresses, development, differentiation, metabolism, and defense (Ambawat et al., 2013). We were especially interested in the motifs likely to affect the reproduction of *G. imbricata*, i.e., those related to the bHLH, Dof and AP2/ERF DNA-binding domain families. As examples of the TFs associated with these motifs, the bHLH family includes Phytochrome Interacting Factors: PIF1, PIF3, PIF5, and PIF6 that respond to light (Heim et al., 2003; Song et al., 2014), and MYB factors: Myc2, Myc3, and Myc4 that respond to jasmonate (Boter et al., 2004; Niu et al., 2010; Schweizer et al., 2013).

#### 3.2. *GiODC* expression

##### 3.2.1. Effects of photoperiod on *GiODC* expression

After normalizing *GiODC* expression, we found that the expression varied for thalli cultivated under the different photoperiods. At the end of the elicitation period for the long-day cycle, *GiODC* expression was 12-fold greater than those of the control and short-day cycle (Table 4). Non-significant differences in ODC normalized





**Abi4** **Dof3**  
 TCGGGTTTGA**GTCCGGCGACT**CTGGACTCAAGGACCCTTATGTCNNNTGGA**AGGTG**AGGTGGCGCTGCTG  
  
**MYC4**  
 GACACTTCATGTNCCCCTATTANTCT**CACTT**GCCCAATAACGATGGCGATACCTCAGCTAATCTGGCCC  
  
**SMZ** **PIF3**  
 CCTCG**TT**CATGATNCATCTTGGAGATCCACTGGGANCTTCATTTTGGAT**CAACGT**GATTCTCTGATTGTGC  
  
 TACTGCCTAAGTTACAGCTATATTNACTTACCCGGATAATATCTCCTGGAGATNCTCCNCTTTGTCTGTGG  
  
**Dof3** **MYC3** **RAV1**  
 AGCTGACTGCGGCTCA**AAAGCGGAATT**CACATG**TCTGTG**TCCA**CAACTT**GACTGTCGAGGTGCTTCTGAAC  
  
 GAAGAACTNCCCCGANNGTAATATTNTCCCGGCTATTCTGTCTAGCAATAGGTCNACTGATGATGGAAA  
  
**Dof2**  
 GATCAAGCGAAAANTTCTATTCTGTCATTGNAGGGCACCGTGACAAGTTAAAGACTTGGCAAGCAGTGCA  
 GTGTTGTCAA**CGTATAACAGGA**T**GCTG**CCCACTATTGGGGTTCGAAGTGCCTGTCTCTGGCAGCTTCACTGAG  
 AAAATGCCACAGTAGGCCGTTTACCGTGTAAAGTGAACCCGGACCCTGTAATGCTGGCGGTTCTGGCCAA**TT**AGGCTGTG  
 GGTTGCACTGTGATCAGAAAGGAAATGGCAACAGTTCTAGACATGGGAGTTGAAGCGGAGTTCGATGTTGCCCATCCATG  
 CAAACCGCGTTGGATCTGGAGTTTGC**AAATTG**AGACTAATGTTACGGTACGCTTCTGCTCGGTACAATCGACAACATCTGTGGC  
 TTGCACGTGGTGC**AAATG**CACTGACCACGAGAAATTGAGTACGTTGGAAGATGTGTGTGTACAGCGGATGACATTTGAC

**Fig. 3.** Selected motifs identified within the *GiODC* 5'-upstream region as described in Materials and methods using the Jaspar Core Database. ATG from the *ODC* gene is bolded and bigger sized.

**Table 4**

Normalized expression of *GiODC* at the ends of the elicitation and disclosure periods for three photoperiods (12-h light/12-dark, 18-light/6-h dark, and 6-h light/18-h dark), a 15-min ethylene treatment, and a 1-h methyl jasmonate.

Treatment	Elicitor period	Disclosure period
Photoperiod		
12-h light/12-h dark	11.7 ± 0.84 (*)	0.84 ± 0.10
6-h light/18-h dark	1.12 ± 0.13	1.11 ± 0.12
18-h light/6-h dark (control)	1.00	1.10 ± 0.13
Ethylene		
15-min treatment	450 ± 1.3 (*)	1.1 ± 0.14
Silver thiosulfate (inhibitor) pre-treatment	1.9 ± 0.1	1.00 ± 0.10
Control (no ethylene or inhibitor)	1.00	0.99 ± 0.10
Methyl jasmonate		
1-h treatment	1.35 ± 0.2	37.13 ± 0.11 (*)
Phenidone (inhibitor) pre-treatment	0.85 ± 0.11	9.1 ± 0.13
Control (without jasmonate and inhibitor)	1.00	1.09 ± 0.10

Data are reported relative to the expression observed for control thalli at the end of the elicitation period. Each value is the mean ± SE of three independent experiments. \*Indicates significant differences between treated and control samples for each elicitor ( $p < 0.05$ ).

expression were shown at the ends of all photoperiod disclosure periods (Table 4).

### 3.2.2. Effect of ethylene on *GiODC* expression

*GiODC* expression was nearly 450-fold greater in thalli that had been exposed to ethylene for 15 min, i.e., at the end of the elicitation period, than in those that had not been treated (Table 4). Whereas at the end of the disclosure period (7 days), the normalized *GiODC* expression was only 1.1-fold greater than that in control thalli which it was not statistically different (Table 4). Normalized expression in thalli pre-treated with silver thiosulfate was similar (1.8- to 2.0-fold greater) to that of the controls values at the end of the elicitation period, and expression at the end of the disclosure period was also similar (1.0- to 1.1-fold), which is expected for an inhibitor whose effect is dependent on incubation time (García-Jiménez and Robaina, 2012).

### 3.2.3. Effect of methyl jasmonate on *GiODC* expression

Unlike the results found for the photoperiod and ethylene experiments, the data obtained for *GiODC* expression after methyl jasmonate treatment clearly showed that *GiODC* was expressed to a greater extent in thalli exposed to methyl jasmonate at the

end disclosure period than in those not exposed (37-fold greater; Table 4), whereas expression in the treated thalli was only 1.3-fold greater than in those not treated at the end of the elicitation time. The normalized expression in the controls was 1.0 at the end of the elicitation time. When thalli were pre-treated with phenidone, *GiODC* expression was reduced 25-fold (corresponding to a nine-fold increase over the expression in the controls) at the end of the disclosure period in comparison with thalli treated only with methyl jasmonate.

## 4. Discussion

Many studies support a role for *ODC* in plant developmental processes (Heiskala et al., 1999; Valdeís-Santiago et al., 2012). Specifically, *GiODC* expression has been shown to be involved in cystocarp maturation, and has also been shown to depend on spatial and temporal regulation that is associated with the development of cystocarps, as the number of *GiODC* transcripts abruptly decreases after cystocarp maturation (García-Jiménez et al., 2009). Given this background, for this study, having first sequenced the *GiODC* 5'-upstream region, we then searched for and found TF-related motifs and regulatory elements in the *GiODC*, which should help us to begin further to understand how *GiODC* acts during seaweed reproduction.

In general, TF-related motifs and regulatory sequences are conserved and have been shown to be biologically significant in higher plants (Riechmann et al., 2000; Nakano et al., 2006). However, owing to the limited genome data for red seaweed species, 5'-upstream motifs have not been well characterized, making it impossible to compare such motifs with those of other organisms, although recent genomic and transcriptome studies for several different algae have been performed (Dittami et al., 2009; Xin Chan et al., 2011, 2012; Colleín et al., 2013; Hu et al., 2014) and have allowed TF-related motifs to be collected into families and super-families.

Efforts that target *G. imbricata* reproduction have specifically focused on the TFs involved in regulation by jasmonate (Myc2, Myc3, and Myc4), light (Dof), and ethylene (RAV, SMZ and Abi4). As the presence of these motifs in the *GiODC* 5'-upstream region probably influences gene expression, our characterization of the expression and regulation of *GiODC* should be added to previously obtained insights.

ODC is the first enzyme involved in the red seaweed cystocarp maturation process (Sacramento et al., 2004). In addition to light (as the photoperiod), ethylene and methyl jasmonate have been shown to cause the induction and maturation of cystocarps and spore release in the red seaweeds *G. imbricata* and *P. capillacea in vitro* (García-Jiménez and Robaina, 2012, 2015). Therefore our results would strengthen the relationship between the action of light and growth regulators and ODC expression. We are aware, however, that more investigations are needed, but at least for red algae, our study can be considered a starting point.

Undoubtedly, monitoring ODC expression is an useful way to analyze its involvement during development. For seaweed, little data are available that correlate reproduction events with the action of elicitors and associated gene expression changes. To ameliorate these deficiencies, we have the advantage that we can monitor *GiODC* expression during the well-defined elicitation and disclosure periods and during cystocarp maturation *in vitro*. In addition, the *in vitro* responses of *G. imbricata* to photoperiods, ethylene, and jasmonate, have been well characterized (Rodrigo, 1998; Sacramento et al., 2004; García-Jiménez and Robaina, 2012). Finally, the reproductive state of *G. imbricata* clearly affects *GiODC* expression as its transcripts are reduced in thalli containing cystocarps in the basal part of the thalli where cystocarps are never located, compared with the apical part where they are (García-Jiménez et al., 2009). Our study has added to the aforementioned knowledge as follows. (i) *GiODC* expression differs over time, i.e., during the elicitation and disclosure periods, and (ii) the effects of the elicitors, light, ethylene, and jasmonate, on *GiODC* expression.

As we found, the expression of *GiODC* displays distinct profiles at the ends of the elicitation and disclosure periods, and is independent of the presence of cystocarps (Table 4). Transcripts of *GiODC* were predominately found during the elicitation period for the long-day photoperiod and ethylene treatments; a period that is defined by the absence of cystocarps (Table 4). Conversely, when the thalli were treated with methyl jasmonate, *GiODC* expression was increased at the end of the disclosure period when developing cystocarps were first visualized (Table 4). This result seems to contradict that previously reported, i.e., *GiODC* expression is inhibited when cystocarps become visible (García-Jiménez et al., 2009). However, this temporal contradiction might be a consequence of a pathway that senses jasmonate but requires the elicitation period to initiate and coordinate its response(s) (see below). Nonetheless, we also need to understand that other regulation mechanisms should be considered when attempting to understand why *GiODC* expression increases during the disclosure period. Additional studies are needed to achieve this goal.

Another question relates to the action of elicitors in cystocarp development. As we have shown, the level of *GiODC* expression is dependent on the type of elicitor, i.e., for ethylene, it is 450-fold greater than the control level; for the long-day period, it is 10-fold greater; and for methyl jasmonate, it is 37-fold greater. These differences strongly suggest that *G. imbricata* has a signaling system that rapidly senses and reacts to ethylene, leading a large and immediate change in the expression of *GiODC*. Ethylene concentrates around submerged *G. imbricata* thalli owing to its small diffusion rate in seawater (García-Jiménez and Robaina, 2012). An effective action by *G. imbricata* to induce cystocarp development when exposed to ethylene would necessitate the capture and accumulation of the gas indicating that thalli can sense ethylene and activate a related signaling route. Conversely, the initiation and progression of cystocarp induction mediated by jasmonate appears to involve a combination of several signaling pathways, such that methyl jasmonate partially activates the *GiODC* response but does not allow for quick responses during the elicitation period. Given these results, we infer that more than one signal for cystocarp development exists, and that probably

the associated signaling pathways use distinct strategies to respond to different signals.

Therefore, in red seaweed, the behavior of signaling pathways, i.e., coupling and uncoupling of perception signals, and activation of different pathways might facilitate mechanisms that effectively induce reproduction in *G. imbricata*. Additional studies on the role(s) and importance of such pathways will help to clarify how *GiODC* and signals related to cystocarp development act.

In conclusion, *G. imbricata* exhibits different patterns of *GiODC* expression when exposed to different elicitors. The temporal patterns of *GiODC* expression during cystocarp development that depend on the type of elicitor of reproduction may be useful tools with which to study the precise transcriptional regulation of *GiODC*.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest in the present investigation

### Author contribution

PGJ and RRR conceived and designed research. PGJ and MMF conducted experiments and analyzed data. PGJ wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

### Acknowledgments

This work was partially financed by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (MINECO, BFU 2010-017248). A fellowship from the ACISI and the Fondo Social Europeo, Programa Operativo Integrado de Canarias 2007–2013, Eje 3 Tema Prioritario 74, to MMF is also acknowledged. The authors also wish to thank a graduate of Marine Sciences, Olegario Brito Romano, for his skillful assistance in preparing materials and carrying out the *in vitro* experiments.

### References

- Adamczyk, B.J., Lehti-Shiu, M.D., Fernandez, D.E., 2007. The MADS domain factors *AGL15* and *AGL18* act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50, 1007–1019.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., Yadav, R.C., 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19 (3), 307–321.
- Bawaja, P., Sahoo, D., García-Jiménez, P., Robaina, R.R., 2009. Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: problems, achievements and prospects. *Phycol. Res.* 57, 45–58.
- Bianchi, M.E., Agresti, A., 2005. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 496–506.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., Prat, S., 2004. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Gen. Dev.* 18, 1577–1591.
- Chan, C.Y., Ho, C., Phang, S.M., 2006. Trends in seaweed research. *Trends Plant Sci.* 11, 165–166.
- Cole, K.M., Sheath, R.G., 1990. *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, New York.
- Collén, J., Porcel, B., Carré, W., Ball, S.G., Chaparro, C., Tonton, T., et al., 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *PNAS* 110, 5247–5252.
- Cucurou, C., Battioni, J.P., Thang, D.C., Nam, N.H., Mansuy, D., 1991. Mechanisms of inactivation of lipoxygenases by phenidone and Bw755c. *Biochemistry* 30, 8964–8970.
- Desveaux, D., Allard, J., Brisson, N., Sygusch, J., 2002. A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA binding surface. *Nat. Struct. Biol.* 9, 7.
- Dittami, S.M., Scornet, D., Petit, J.L., Seigürens, B., Da Silva, C., Corre, E., et al., 2009. Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress. *Genome Biol.* 10, R66.
- Franco-Zorrilla, J., Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoya, M., Vera, P., Solano, R., 2014. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *PNAS* 111, 2367–2372.
- García-Jiménez, P., Robaina, R.R., 2012. Effects of ethylene on tetrasporogenesis in *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 48 (3), 710–715.



- García-Jimenez, P., Robaina, R.R., 2015. On reproduction in red algae: further research needed at the molecular level. *Front. Plant Sci.* 6, 1–6.
- García-Jimenez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cairdenas, J.A., Ferrandiz, C., Robaina, R.R., 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Hyalmeniaceae). *J. Plant Physiol.* 166, 1745–1754.
- García-Jimenez, P., Brito-Romano, O., Robaina, R.R., 2013. Production of volatiles by the red seaweed *Gelidium arbuscula* (Rhodophyta) emission of ethylene and dimethyl sulfide. *J. Phycol.* 49, 661–669.
- Giraud, E., Van Aken, O., Ho, L.H.M., Whelan, J., 2009. The transcription factor AB14 is a regulator of mitochondrial retrograd expression of ALTERNATIVE OXIDASE1. *Plant Physiol.* 150, 1286–1296.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L., Kater, M.M., 2008. AGAMOUS-LIKE24 and SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in Arabidopsis. *Plant J.* 56, 891–902.
- Gregis, V., Sessa, A., Dorca-Fornell, C., Kater, M.M., 2009. The Arabidopsis floral meristem identity genes AP1, AGL24 and SVP directly repress class B and C floral homeotic genes. *Plant J.* 60 (4), 626–637.
- Gubler, F., Raventos, D., Keys, M., Watts, R., Mundy, J., Jacobsen, J.V., 1999. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant J.* 17 (1), 1–9.
- Guzmán-Urióstegui, A., Robledo, D., Robaina, R.R., 2002. Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 38, 1169–1175.
- Hayashi, S., Murakami, Y., Matsuji, S., 1996. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem. Sci.* 21, 27–30.
- He, J.X., Gendron, J.M., Sun, Y., Gampala, S.S., Gendron, N., Sun, C.Q., et al., 2005. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307 (5715), 1634–1638.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., Bailey, P.C., 2003. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* 20 (5), 735–747.
- Heiskala, M., Zhang, J., Hayashi, S., Höltta, E., Andersson, L.C., 1999. Translocation of ornithine decarboxylase to the surface membrane during cell activation and transformation. *EMBO J.* 18 (5), 1214–1222.
- Henriksson, E., Olsson, A.S., Johansson, H., Johansson, H., Hanson, J., Engström, P., et al., 2005. Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol.* 139 (1), 509–518.
- Hu, J., Wang, D., Li, J., Jing, G., Ning, K., Xu, J., 2014. Genome-wide identification of transcription factors and transcription-factor binding sites in oleaginous microalgae *Nannochloropsis*. *Sci. Rep.* 4 (545), 1–11.
- Huang, H., Tudor, M., Weiss, C.A., Hu, Y., Ma, H., 1995. The Arabidopsis MADS-box gene AGL3 is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol. Biol.* 28 (3), 549–567.
- Kagale, S., Links, M.G., Rozwadowski, K., 2010. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 152, 1109–1134.
- Kang, H., Oh, E., Choi, G., Lee, D., 2010. Genome-wide DNA-binding specificity of PIL5, an Arabidopsis basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor. *Int. J. Data Min. Bioinformatics* 4 (5), 588–599.
- Kolodrubetz, D., 1990. Consensus sequence for HMG1-like DNA binding domains. *Nucleic Acids Res.* 18 (18), 5565.
- Lang, D., Weiche, B., Timmerhaus, G., Richardt, S., Rian'o-Pachoin, D.M., Corrêa, L.G.G., et al., 2010. Genome-wide phylogenetic comparative analysis of plant transcriptional regulation: a timeline of loss, gain, expansion, and correlation with complexity. *Genome Biol. Evol.* 2, 488–503.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., Perat, P., 2013. APETALA2/ethylene responsive factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol.* 199, 639–649.
- Lijavetzky, D., Carbonero, P., Vicente-Carbajosa, J., 2003. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. *BMC Evol. Biol.* 3, 17.
- Marton, L.J., Pegg, A.E., 1995. Polyamines as target for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 55–91.
- Moreno-Risueno, M.A., Martínez, M., Vicente-Carbajosa, J., Carbonero, P., 2006. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Mol. Genet. Genom.* 277, 379–390.
- Mukherjee, K., Brocchieri, L., Bürglin, T.R., 2009. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Mol. Biol. Evol.* 26 (1), 2775–2794.
- Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 19.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi, H., 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 140, 411–432.
- Niu, Y., Figueroa, P., Browse, J., 2010. Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 62 (6), 2143–2154.
- Radhika, V., Kost, C., Boland, W., Heil, M., 2010. The role of jasmonates in floral nectar secretion. *PLoS One* 5 (2), 1–6.
- Rian'o-Pachoin, D.M., Corrêa, L.G.G., Trejos-Espinosa, R., Mueller-Roeber, B., 2008. Green transcription factors: a Chlamydomonas overview. *Genetics* 179, 31–39.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., et al., 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290, 2105–2110.
- Riechmann, J.L., 2002. Transcriptional regulation: a genomic overview. In: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, California, pp. 2–46.
- Rodrigo, M., 1998. Desarrollo en macroalgas: sustancias reguladoras, fisiología y diferenciación celular (tetrasporogénesis) durante los estadios de crecimiento in vitro del alga roja *Grateloupia doryphora*. In: Ph.D. Thesis. University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Sacramento, A.T., García-Jimenez, P., Alcázar, R., Tiburcio, A.F., Robaina, R.R., 2004. Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Hyalmeniaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 40, 887–894.
- Sacramento, A.T., García-Jimenez, P., Robaina, R.R., 2007. Spermine induces cystocarp development in marine alga. *Plant Growth Regul.* 53, 47–154.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *BBRC* 290, 987–1009.
- Saleh, A., Pagés, M., 2003. Plant AP2/ERF transcription factors. *Genetika* 35 (1), 37–50.
- Schweizer, F., Fernández-Calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., et al., 2013. Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* 25, 3117–3132.
- Silver, J., Keerikatte, V., 1989. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J. Virol.* 63 (5), 1924–1928.
- Song, Y., Yang, C., Gao, S., Zhang, Z., Li, L., Kuai, B., 2014. Age-triggered and dark-induced leaf senescence require the bHLH transcription factors PIF3 4, and 5. *Mol. Plant* 7, 1776–1787.
- Sridhar, V.V., Surendrarao, A., Liu, Z., 2006. APETALA1 and SEPALLA-TA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during X over development. *Development* 133, 3159–3166.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Quail, P.H., 2003. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15, 1749–1770.
- Triglia, T., Peterson, M.G., Kemp, D.J., 1988. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16, 16.
- Valdeís-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J.A., Leóin-Ramírez, C.G., Ruiz-Herrera, J.L., 2012. Polyamine metabolism in fungi with emphasis on phytopathogenic species. *J. Amino Acids*, 1–13.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et al., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12.
- Vandesompele, J., Kubista, M., Pfaffl, M.W., 2009. In: Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. (Eds.), *Reference Gene Validation Software for Improved Normalization in Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press, London, pp. 47–64.
- Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R., Laue, E.D., Thomas, J.O., 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.* 12 (4), 1311–1319.
- Xie, K., Wu, C., Xiong, L., 2006. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in Rice. *Plant Physiol.* 142 (1), 280–293.
- Xin Chan, C., Chan Yang, E., Banerjee, T., Su Yoon, H., Martone, P.T., Estevez, J.M., et al., 2011. Red and green algal monophyly and extensive gene sharing found in a rich repertoire of red algal genes. *Curr. Biol.* 21, 328–333.
- Xin Chan, C., Blouin, N.A., Zhuang, Y., Zäuner, S., Prochnik, S.E., Lindquist, E., et al., 2012. Porphyra (Bangiales) transcriptomes provide insights into red algal development and metabolism. *J. Phycol.* 48, 1328–1342.
- Yanagisawa, S., Sheen, J., 1998. Involvement of maize dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10, 75–89.

## Trabajos científicos adicionales

García-Jiménez, P., Montero-Fernández, M., Robaina, R.R. Molecular mechanisms underlying the red algae carposporogenesis in methyl jasmonate-mediated responses (*en revisión*).

Montero-Fernández, M., Robaina, R.R., García-Jiménez, P. Ethylene-induced differential expression of polyamines and ethylene biosynthetic-related genes in the red macroalgae *Gracilaria imbricata* during *in vitro* carposporogenesis (*en preparación*).







**Unión Europea**  
Fondo Social Europeo



**Gobierno  
de Canarias**

Consejería de Economía,  
Industria, Comercio y Conocimiento

Agencia Canaria de Investigación,  
Innovación y Sociedad  
de la Información

Esta tesis ha sido cofinanciada por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI) y por el Fondo Social Europeo (FSE), eje 3, prioridad de inversión 10.2, objetivo específico 10.2.1, con una tasa de cofinanciación del 85% del Programa Operativo FSE de Canarias 2014-2020.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

TESIS DOCTORAL

---

Montserrat Montero Fernández  
Las Palmas de Gran Canaria - 2017