

Tesis defendida por

**Alma Carolina Castañeda Vega**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Ernesto García Mendoza

Director del Comité

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Miembro del Comité

---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Miembro del Comité

---

Dra. Ma. Lucila del Carmen Lares Reyes

Coordinador del  
Posgrado en Ecología Marina

---

Dr. Jesús Favela Vara

Director de la  
Dirección de Estudios de Posgrado

Junio, 2014

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

Programa de Posgrado en Ciencias  
en Ecología Marina

---

Identificación de proteínas involucradas en la fotoprotección del alga parda  
*Macrocystis pyrifera*

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:  
**Alma Carolina Castañeda Vega**

Ensenada, Baja California, México  
2014

Resumen de la tesis de Alma Carolina Castañeda Vega, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

Identificación de proteínas involucradas en la fotoprotección del alga parda  
*Macrocystis pyrifera*

Resumen aprobado por:

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
Director de Tesis

Resumen

La disipación térmica del exceso de energía es uno de los mecanismos de fotoprotección más importantes de plantas y algas, ya que proporciona resistencia a condiciones de estrés lumínico. La disipación no fotoquímica de la fluorescencia del fotosistema II (NPQ por sus siglas en inglés) es el proxy utilizado para medir la disipación térmica. En plantas, tres elementos son esenciales para el control del NPQ: la acidificación del lumen tilacoidal, la protonación de la proteína PsbS y la interconversión de los pigmentos carotenoides a través del ciclo de las xantofilas. El NPQ en el alga café *Macrocystis pyrifera* está controlado principalmente por el ciclo de las xantofilas pero no se conocen las proteínas que intervienen en la regulación de este proceso y no se han detectado homólogos del gen que codifica para la proteína PsbS en plantas. Por lo tanto, la(s) proteína(s) involucradas en la disipación térmica de esta alga deben ser distintas a las de plantas. El objetivo de este estudio fue el de identificar a las proteínas que podrían estar involucradas en el control del NPQ en *M. pyrifera*. Se evaluó la concentración de proteínas en tejido colectado a diferentes profundidades de la columna de agua, así como los cambios en la expresión de proteínas de la antena durante un periodo de aclimatación de tejido a baja luz. Se utilizaron 3 anticuerpos contra proteínas de las antenas periféricas de diatomeas y plantas superiores (anti-LHCSR, anti-Fcp2 y anti-Fcp6) para evaluar los niveles de expresión de proteínas reconocidas por estos anticuerpos bajo diferentes condiciones de fotoaclimatación. Asimismo, se midió la capacidad de NPQ y la concentración de pigmentos en cada una de las aproximaciones anteriores. Se observó una mayor concentración de las proteínas detectadas por el anti-LHCSR y el anti-Fcp6 en tejido aclimatado a altas irradiancias (superficie) con respecto a tejido aclimatado a baja luz. Esta concentración se asoció a una alta capacidad de NPQ y una alta concentración del pigmento fotoprotector zeaxantina. Por otro lado, durante la aclimatación de tejido colectado en superficie y expuesto a baja luz, se observó una disminución en la expresión de las proteínas detectadas por los anticuerpos anti-LHCSR y anti-Fcp6 de aproximadamente 22 kDa, así como una reducción en la capacidad de NPQ asociada a una disminución en la actividad del ciclo de las xantofilas. No se detectaron cambios en la expresión de la proteína de 18 kDa detectada por el anti-Fcp2, lo que sugiere que este tipo de antenas no presentan una modulación con respecto a los cambios de luz. En este trabajo se propone que la proteína de la antena de un peso molecular de aproximadamente 22 kDa interviene en la inducción del NPQ en *M. pyrifera*. Probablemente el sitio de quenching está presente en esta proteína de acuerdo al modelo del control de este proceso propuesto para algas café.

Palabras clave: **disipación térmica, ciclo de xantofilas, proteínas de la familia LHCSR, *Macrocystis pyrifera***

Abstract of the thesis presented by Alma Carolina Castañeda Vega as a partial requirement to obtain the Master degree in Marine Ecology.

Identification of proteins involved in the photoprotection of the brown algae  
*Macrocystis pyrifera*

Abstract approved by:

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
Director de Tesis

Abstract

The thermal dissipation of excess energy represents an important photoprotective mechanism in plants and algae, providing resistance under stress conditions. The non photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence of photosystem II (NPQ) is the proxy to measure the thermal dissipation. Three elements are essential to induce NPQ in plants: the thylakoid lumen acidification, the protonation of PsbS protein and the pigment interconversion of the carotenoids involved in the xanthophyll cycle. In the brown alga *Macrocystis pyrifera* the NPQ is strongly related to xanthophyll cycle pigment interconversion, but it is not known which proteins are involved in the regulation of this process. Since no homologs of the PsbS gene of plants has been detected in brown algae, the protein(s) involved in the regulation of thermal dissipation in these algae must be different from those that regulate NPQ in plants. The goal of this study was to identify the proteins involved in NPQ development in *M. pyrifera*. Therefore, protein concentration was evaluated in tissue collected at different depths of the water column, as well as changes in the expression pattern of antenna proteins during acclimation to low light of blades collected at surface. Anti-LHCSR, anti-Fcp2 and anti-Fcp6, raised against peripheral antenna proteins of green algae and diatoms, were used to evaluate the expression levels of proteins recognized by these antibodies under different photoacclimation conditions. Also, we measure the NPQ capacity and pigment concentration in the previous approaches. The concentration of proteins of 22 kDa recognized by the anti-LHCSR and anti-Fcp6 was higher in high light acclimated tissue in contrast to low light acclimation. The high levels of these proteins were associated with a high NPQ capacity and a high concentration of the photoprotective pigment, zeaxanthin. Furthermore, a reduction in the expression of the proteins recognized by the anti-LHCSR and anti-Fcp6 antibodies was detected during the low light acclimation of tissue previously acclimated to high light. In parallel, NPQ capacity and the xanthophyll cycle activity decreased during the acclimation period. We did not detect changes in expression of the 18 kDa protein recognized by the anti-Fcp2, suggesting that the concentration of this protein is not regulated with changes in the light intensity. We propose that a protein of about 22 kDa in size is involved in the NPQ induction of *M. pyrifera*. Probably the quenching sites are present in this protein, according to the regulatory model proposed to brown algae.

Key words: **thermal dissipation, xanthophyll cycle, LHCSR proteins, *Macrocystis pyrifera*.**

*A mis puntos cardinales*

*Papá, Mamá, Ali y Luiso.*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, por la oportunidad otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Conacyt por el apoyo económico otorgado a través del programa de becas de maestría.

A los miembros del comité por su apoyo en las diferentes etapas del desarrollo de esta tesis. Al Dr. Axayácatl Rocha por sus oportunos comentarios durante el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Alexei Licea por su interés y sugerencias en el desarrollo de las técnicas de análisis de proteínas.

Al Dr. José Luis Stephano, quien aunque no de manera formal, también formó parte de mi comité de tesis. Siempre entusiasta y con la mejor disponibilidad de socorrer a cualquier estudiante con problemas “técnicos”. Gracias por abrirme las puertas del Lab. Meredith Gould 24/7.

Al laboratorio de Ecología Molecular de CICESE y su equipo de trabajo, especialmente a Pablo, Nancy, Mariana, Geo, Fra y Ana por la ayuda y consejos en la etapa experimental. Al laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE, especialmente a la Dra. Johanna Bernáldez y a la M. en C. Samanta Jiménez por la ayuda en el desarrollo de las técnicas de extracción de proteínas y la buena disponibilidad para el préstamo de equipo. Al laboratorio de Ecología de Microbios Marinos dirigido por el Dr. Helmut Maske, por el préstamo del equipo de espectrofotometría. Agradezco al técnico M. en C. Cesar Almeda y al estudiante de Doctorado Ricardo Cruz por el apoyo brindado en este laboratorio.

A los técnicos M. en C. Ignacio Romero y M. en C. Arturo Ocampo por el apoyo académico y moral. A la Dra. Sánchez Castrejón por el apoyo en el desarrollo de las técnicas de detección de anticuerpos, gracias por los consejos y tu tiempo Edna.

Al primo hermano del laboratorio de Biología Algal, el Ficotox y todos sus técnicos, en especial al M. en C. Axel Rosas por el apoyo con las técnicas de cromatografía.

A mi apoyo logístico en campo, Georgina Ramírez y Ricardo Cruz, solo gracias a ustedes lograba llegar con energía al laboratorio para maquilar discos de *Macrocystis*. Gracias Ginger por el S.O.S. en el mar profundo. Gracias Richie por tu valiosa ayuda en absolutamente todo lo que se me trababa.

A mis compañeros de generación (Oscar, Meli, Mariana, Adri, Marlon, Manuel, Rosa, Lau y Gera) y los muchos adjuntos, por los días de estudio y todo lo demás. Gracias Kena por el último empujón.

A las niñas de lejos, de ustedes aprendí las buenas costumbres del trabajo en laboratorio, a ustedes las culpo de mis jornadas interminables por tratar siempre de mejorar. Gracias Nadine e Ivonne.

A mi familia. A papá, por el apoyo en todos y cada uno de mis planes de vida, aún cuando no estás muy de acuerdo, se que igual disfrutas mis logros. A mamá, tu no me dejas caer nunca, a ti no tengo como agradecerte los hot dogs en las noches de extracciones. Alina mi ejemplo de perfección encarnado, tu sabes bien que en muchos momentos fuiste fuente de inspiración. Luis

Omar, no más prórroga. Gracias por atender a mis llamados de auxilio y hacerme reír cada que podías. Gracias Miki por sacarme de los días de rutina y hacerme disfrutar aún en esos días difíciles. A Naye, por que simplemente tu siempre estás en el momento y tiempo justo. A Gerardo, por que no hay paso en el desarrollo de esta tesis en el que no hayas estado presente. Campo, laboratorio, escritorio, mañana, tarde y noche. Contigo estoy en deuda.

A mi sensei y coautor, cómplice en este largo camino recorrido. Sobre todas las cosas tu me haz guiado en el camino de la luz, literal. Contigo comparto los créditos de éste pequeño logro. Gracias Neto.

## Contenido

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	4
1.1.1 NPQ y el ciclo de las xantofilas en plantas y algas	4
1.1.2 <i>Macrocystis pyrifera</i> como modelo de estudio	8
2. Justificación	11
3. Objetivo general	11
3.1 Objetivos particulares	11
4. Hipótesis	12
5. Materiales y métodos	13
5.1 Material de estudio	13
5.2 Extracción de proteínas	13
5.2.1 Protocolo I (Popovic <i>et al.</i> , 1983 modificado)	13
5.2.2 Protocolo II (Nagai <i>et al.</i> , 2008)	14
5.2.3 Protocolo III (Contreras <i>et al.</i> , 2008)	14
5.2.4 Protocolo IV (Wang <i>et al.</i> , 2003)	15
5.2.5 Protocolo V (Wang <i>et al.</i> , 2003) modificado	15
5.3 Análisis de proteínas	17
5.3.1 Preparación de las muestras	17
5.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	17

5.3.3	Inmunodetección de proteínas (Western blot)	17
5.4	Medición de fluorescencia de clorofila <i>a</i>	18
5.5	Análisis de pigmentos	19
5.6	Aproximaciones experimentales	20
5.6.1	Perfil de proteínas, concentración de pigmentos y NPQ en tejido de <i>Macrocystis pyrifera</i> aclimatado a diferentes profundidades	20
5.6.2	Bioensayos de aclimatación	21
5.7	Análisis estadísticos	23
6.	Resultados	24
6.1	Comparación de métodos de extracción de proteínas totales	24
6.2	NPQ y concentración de proteínas y de pigmentos en tejido de <i>M. pyrifera</i> colectado a diferentes profundidades	27
6.2.1	Comparación de perfiles de proteínas en tejido colectado a diferentes profundidades	27
6.2.2	Ensayos de inmunodecoración	30
6.2.3	Concentración de pigmentos y NPQ de tejido colectado a diferentes profundidades	35
6.3	Cambio en la concentración de pigmentos, expresión de NPQ y proteínas en tejido de <i>M. pyrifera</i> aclimatado a diferentes irradiancias	37
6.3.1	Variación de Fv/Fm y NPQ en tejido expuesto a diferentes irradiancias	37
6.3.2	Concentración de pigmentos	42
6.3.3	Expresión diferencial de proteínas durante aclimatación a baja luz	47
7.	Discusión	50

7.1	Expresión de proteínas, ciclo de las xantofilas y NPQ en tejido colectado a diferentes profundidades de la columna de agua	50
7.2	Cambios en la expresión de proteínas en respuesta a la aclimatación de <i>M. pyrifera</i> a diferentes condiciones ambientales	56
	Conclusiones	61
	Referencias bibliográficas	62

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Vías de de-excitación de la energía absorbida por la clorofila <i>a</i> .	2
2	Representación esquemática del modelo de qE en plantas.	5
3	Representación esquemática de las respuestas de plantas, líquenes, algas verdes y diatomeas a la luz en exceso.	7
4	Representación de un organismo adulto de <i>Macrocystis pyrifera</i> .	8
5	Modelo de control del NPQ en el alga café <i>Macrocystis pyrifera</i> .	10
6	Diagrama de los pasos para la extracción de proteínas de <i>Macrocystis pyrifera</i> utilizando el protocolo de Wang <i>et al.</i> (2003) modificado (Protocolo V).	16
7	Protocolos utilizados para evaluar la fisiología fotosintética y la concentración de proteínas y pigmentos en tejido de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectado a diferentes profundidades de la columna de agua.	21
8	Representación esquemática de los pasos realizados para llevar a cabo los bioensayos de aclimatación.	23
9	Separación de proteínas mediante SDS-PAGE al 12 %.	24
10	Separación de proteínas mediante SDS-PAGE al 15 %.	26
11	Perfil de proteínas de <i>Macrocystis pyrifera</i> separadas mediante SDS-PAGE de gradiente 4-20 %.	27
12	Cuantificación de la intensidad de banda, expresada en unidades arbitrarias, correspondiente a proteínas en el intervalo de los 16 a los 26 kDa, en las que se detectaron cambios de concentración entre perfiles proteicos de tejido colectado a 0 m (barras negras) y 10 m (barras grises) de profundidad.	28
13	Perfil de proteínas de tejido de <i>Macrocystis</i> separadas por SDS-PAGE al 15 % (17-32 kDa).	29
14	Cuantificación de la intensidad de banda, expresada en unidades arbitrarias, correspondiente a proteínas en el intervalo de los 17 a los 26 kDa, en las que se detectaron cambios de concentración entre perfiles proteicos de tejido colectado a 0 m (barras negras) y 10 m (barras grises) de profundidad.	30

15	Inmunodetección con los anticuerpos anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2 de proteínas de frondas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades.	31
16	Cuantificación de la intensidad de banda expresada en unidades arbitrarias correspondiente a las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-LHCSR, anti-Fcp6, anti-Fcp2-1 y anti-Fcp2-2 de tejido colectado a 0, 3, 6 y 10 m de profundidad.	32
17	Inmunodetección con anticuerpos anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2 de extractos proteicos de frondas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades.	33
18	Cuantificación de la intensidad de banda expresada en unidades arbitrarias, correspondiente a las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-LHCSR, anti-Fcp6, anti-Fcp2 de tejido colectado a 0, 3, 6 y 10 m de profundidad.	34
19	Concentración de pigmentos en frondas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades en la columna de agua.	35
20	Variación de la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm) (A, C, E) y del quenching no fotoquímico de la emisión de fluorescencia (NPQ) (B, D, F) durante el periodo de aclimatación a alta (AL) y baja (BL) luz.	38
21	Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) medida en el primer y último día (barras negras y grises respectivamente) de los bioensayos del tratamiento de aclimatación a BL.	39
22	Disipación no fotoquímica (NPQ) medida en el primer y último día (barras negras y grises, respectivamente) de los bioensayos del tratamiento de aclimatación a BL.	40
23	Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) medida en el primer y último día (barras negras y grises respectivamente) de los bioensayos del tratamiento de aclimatación a AL.	41
24	Disipación no fotoquímica (NPQ) medida en el primer y último día (barras negras y grises respectivamente) del tratamiento de aclimatación a BL.	42
25	Concentración de fucoxantina en tejido de <i>Macrocystis pyrifera</i> durante el periodo de aclimatación a baja luz.	43
26	Concentración de la Chl <i>c</i> y $\beta$ -caroteno en tejido de <i>Macrocystis pyrifera</i> durante el periodo de aclimatación a baja luz.	44
27	Concentración del conjunto de los pigmentos del ciclo de las xantofilas ( $\Sigma$ CX) y de la violaxantina en tejido de <i>Macrocystis pyrifera</i> durante el periodo de aclimatación a baja luz.	45

28	Concentración de anteraxantina y zeaxantina en tejido de <i>Macrocystis pyrifera</i> durante el periodo de aclimatación a baja luz.	46
29	Variación del estado de de-epoxidación (DPS) en tejido de <i>Macrocystis pyrifera</i> durante el periodo de aclimatación a baja luz.	47
30	Inmunodetección con los anticuerpos anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2 de proteínas de <i>Macrocystis pyrifera</i> .	48
31	Cuantificación de la intensidad de banda correspondiente a las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-LHCSR (A), anti-Fcp6 (B) y anti-Fcp2 (C) de muestras de <i>Macrocystis pyrifera</i> en el día 1 (barras negras) y 8 (barras grises) de aclimatación a baja luz.	49

**Lista de tablas**

Tabla		Página
1	Concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas en frondas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades en la columna de agua.	36

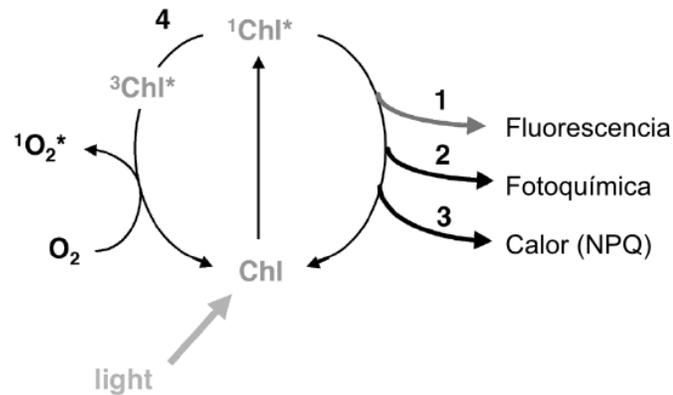
## 1. Introducción

---

La cantidad de luz en los ambientes naturales puede variar en diferentes órdenes de magnitud y tiempo (Allen, 1998), por lo que los fotótrofos han desarrollado mecanismos para optimizar la captación de este recurso cuando es limitante y minimizar su efecto negativo cuando se presenta en exceso. Los organismos fotosintéticos pueden absorber más energía de la que pueden utilizar en las reacciones de fotosíntesis y esta energía en exceso puede causar daño fotooxidativo en el aparato fotosintético, especialmente en el fotosistema II (FSII), que se manifiesta como fotoinhibición y reducción de la actividad fotosintética, el crecimiento y productividad del organismo (Takahashi y Badger, 2011).

La fotoinhibición se manifiesta como una disminución, transitoria o permanente, en la eficiencia cuántica de los fotosistemas (moles de CO<sub>2</sub> fijado por moles de fotones absorbidos) (Osmond, 1994). Específicamente, se refleja como una disminución de los FSII activos y debido a que estos presentan una tasa de reparación relativamente lenta, la reducción de la eficiencia cuántica del FSII normalmente persiste durante varias horas, aun en condiciones de oscuridad o baja luz (Ohad *et al.*, 1984; Ruban *et al.*, 2012). Debido a la necesidad de reducir el proceso de fotoinhibición en ambientes de alta luz, se ha generado una fuerte presión selectiva de mecanismos que reducen la acumulación del exceso de energía en la maquinaria fotosintética (Bjorkman y Demmig-Adams, 1995).

Los mecanismos de fotoprotección pueden agruparse en los que previenen la absorción de luz, los que disipan el exceso de energía absorbida por el aparato fotosintético y los que eliminan las especies tóxicas generadas por el daño fotooxidativo (Demmig-Adams y Adams, 1992). De estos, el más importante es la disipación térmica del exceso de energía en el aparato fotosintético. Cuando la energía de un fotón ha sido absorbida por la clorofila *a* (Chl *a*), esta molécula es llevada a un estado excitado y regresa a su estado basal por medio de diferentes vías (Fig. 1). La energía de excitación puede ser reemitida como fluorescencia, transferida a los centros de reacción (fotoquímica), disipada como calor o puede formar estados tripletes excitados de la Chl *a* (Müller *et al.*, 2001). La reducción no fotoquímica de la fluorescencia del fotosistema II (NPQ) se utiliza como un proxy para la medición de la disipación térmica (DT).



**Figura 1. Vías de de-excitación de la energía absorbida por la clorofila *a*. (1) Emisión de fluorescencia; (2) Fotoquímica; (3) Disipación en forma de calor, DT; (4) Formación de estados tripletes excitados de la clorofila *a* y posterior formación de radicales libres de oxígeno. La reducción no fotoquímica de la fluorescencia del FSII (NPQ) se utiliza como proxy para la medición de la disipación en forma de calor. Modificado de Müller *et al.*, 2001.**

La DT de la energía en exceso es un mecanismo altamente regulado en el que intervienen proteínas y pigmentos fotoprotectores específicos (Wilhem y Selmar, 2011). De los diferentes elementos que intervienen en la regulación de la DT en plantas superiores, el gradiente de protones que se forma a través de la membrana tilacoide ( $\Delta\text{pH}$ ) es un mecanismo de control fundamental, ya que permite un cambio rápido de la función de la antena del FSII: bajo condiciones de alta luz este complejo puede actuar como un disipador de energía, mientras que bajo condiciones de luz subsaturante funciona como un colector de energía eficiente (de Bianchi *et al.*, 2010). La detección de la reducción del pH en el lumen (formación del  $\Delta\text{pH}$ ) y la transferencia de la señal a proteínas específicas del FSII está mediada por la proteína PsbS en plantas superiores (Li *et al.*, 2002). La protonación de esta proteína induce cambios alostéricos y separación de complejos proteico-pigmentarios de la antena pigmentaria del FSII, que dan origen a una inducción rápida del NPQ (de Bianchi *et al.*, 2010). Otro de los procesos involucrados en el control de la DT en plantas está asociado a la síntesis del carotenoide zeaxantina a través del ciclo de las xantofilas (CX). El CX consiste en la de-epoxidación del carotenoide violaxantina a zeaxantina en condiciones de luz en exceso, y la reacción inversa se lleva a cabo en condiciones de oscuridad (Yamamoto *et al.*, 1962). La violaxantina funciona como un pigmento colector de energía y transfiere esta energía a la Chl *a* de los centros de reacción, mientras que la zeaxantina actúa como un pigmento fotoprotector, absorbiendo la energía en exceso en la antena proteico

pigmentaria y disipándola como calor de manera segura (Morosinotto *et al.*, 2003). El CX genera una inducción lenta del NPQ independiente de la proteína PsbS, ya que la DT dependiente de la formación de zeaxantina se activa aun en ausencia de dicha proteína (Nilkens *et al.*, 2010).

Existen pocos trabajos sobre la caracterización de los mecanismos involucrados en la DT en algas cafés y ninguno sobre el papel que juegan las proteínas de las antenas proteico-pigmentarias en este proceso. Se ha reportado que en *Macrocystis pyrifera* el control molecular de la DT es diferente al de las plantas superiores (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007; García-Mendoza *et al.*, 2011; Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013). Las hojas del dosel (superficie) de *Macrocystis* presentan niveles de NPQ significativamente mayores a los reportados en plantas vasculares (Colombo-Pallotta *et al.*, 2006). Esta “súper” capacidad de NPQ está asociada con una alta acumulación de zeaxantina, ya que la DT se ha relacionado solamente con la actividad del) CX y, en contraste con plantas superiores, no está controlada por el  $\Delta\text{pH}$  (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007).

Además de los pigmentos de-epoxidados indispensables para la regulación de la DT, un factor importante para la formación del NPQ es el sitio de unión de estos pigmentos. Estos sitios de unión probablemente estén ubicados en las antenas periféricas de los centros de reacción. Sin embargo, no se han identificado las proteínas involucradas en la regulación y control de la DT en *M. pyrifera* que pudieran estar asociadas a los pigmentos fotoprotectores. Recientemente se reportó la presencia de genes que codifican a la familia de proteínas LHCSR (“Light harvesting complex stress response proteins”) en el alga parda *Ectocarpus siliculosus* (Cock *et al.*, 2010). En *M. pyrifera* se detectó una transcripción alta de genes que codifican para proteínas de esta familia en tejido colectado en la superficie (expuesto a alta luz) comparado con tejido colectado a mayor profundidad (Konotchick *et al.*, 2013), lo cual indica que probablemente jueguen un papel importante en el control de la DT.

Un control diferencial del NPQ entre algas pardas y plantas superiores, dos grupos filogenéticos divergentes, tiene implicaciones evolutivas importantes ya que indica que el control molecular de la disipación térmica en el aparato fotosintético evolucionó de manera diferencial en organismos que poseen arreglos diferentes del sistema colectores de luz, aun cuando tengan un ciclo de las xantofilas similar (García-Mendoza *et al.*, 2011). Las proteínas del FSII juegan un

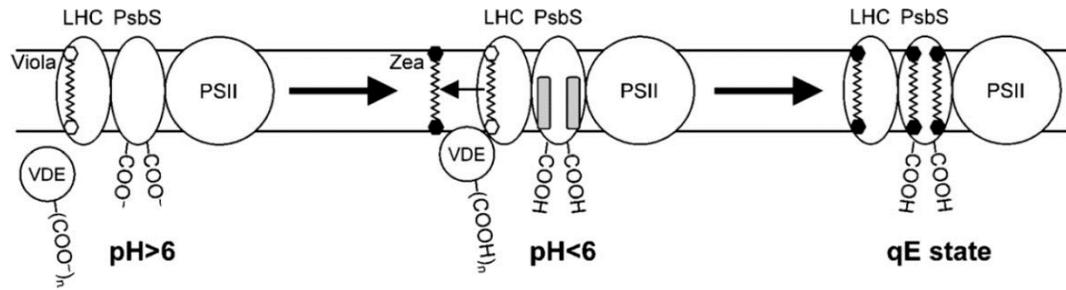
papel fundamental en la regulación de este proceso, por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se plantea identificar las proteínas asociadas con el proceso de inducción de la de DT en *M. pyrifera*, teniendo como candidatas a proteínas de la familia LHCSR.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 NPQ y el ciclo de las xantofilas en Plantas y Algas**

El NPQ en plantas es un proceso complejo y altamente regulado que consta de cuatro componentes: (1) qE, "quenching" dependiente del  $\Delta\text{pH}$ , (2) qT, "quenching" generado por los estados de transición, (3) qI, "quenching" debido a la fotoinhibición del fotosistema II y (4) qZ, el cual depende de la presencia del pigmento fotoprotector zeaxantina, localizado en los complejos antena (Nilkens *et al.*, 2010; Wilhelm y Selmar 2011; Jahns y Holzwarth, 2012).

La inducción de qE ocurre cuando hay una acidificación del lumen bajo condiciones de alta luz, por lo que se establece un  $\Delta\text{pH}$  a través de la membrana tilacoide (Fig. 2). La inducción del estado de disipación de energía parece estar mediado por dos procesos complementarios (de Bianchi *et al.*, 2010). El primer evento consiste en la protonación de dos residuos expuestos al lumen de la proteína PsbS, lo cual induce la disociación de la antena periférica del FSII, en donde se lleva a cabo la mayor parte de la reducción no fotoquímica de la fluorescencia de la Chl *a* (de Bianchi *et al.*, 2010). El segundo evento es la activación de la violaxantina de-epoxidasa, enzima que cataliza la formación de zeaxantina (pigmento fotoprotector) a partir de la violaxantina preexistente.



**Figura 2. Representación esquemática del modelo de qE en plantas. (Izquierda) Bajo condiciones de luz limitante el pH del lumen tilacoidal es mayor a 6 y la violaxantina se encuentra unida a los complejos antena (Centro). A una irradiancia saturante el pH del lumen tilacoidal se reduce, induciendo la protonación de la proteína PsbS y la actividad de la enzima violaxantina de-epoxidasa que convierte a la violaxantina en zeaxantina (Derecha). La unión de la zeaxantina a sitios específicos de la PsbS induce la disipación térmica. Otras moléculas de zeaxantina se unen a otras proteínas de la antena periférica donde también se lleva a cabo la disipación de calor en el aparato fotosintético. Imagen tomada de Niyogi *et al.*, 2004.**

La reorganización de la antena del FSII induce la disipación térmica en segundos (de Bianchi *et al.*, 2010; Horton *et al.*, 2008), por lo que la DT asociada a la formación del qE es una respuesta fisiológica importante a condiciones de estrés lumínico. Mutantes del *Arabidopsis thaliana* incapaces de expresar el qE son menos resistentes al estrés lumínico (Li *et al.*, 2002) y poseen una “aptitud” ecológica menor en ambientes lumínicos altamente variables en comparación con cepas silvestres (Kulheim *et al.*, 2002).

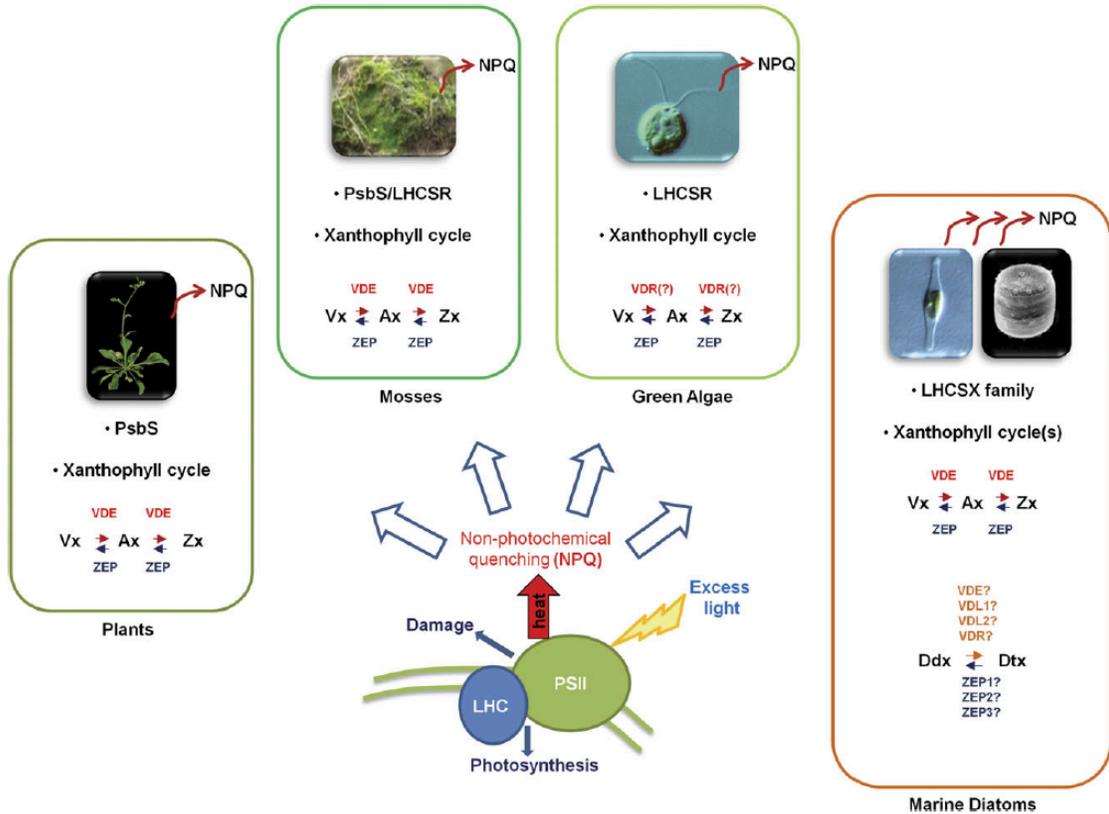
Los sistemas fotosintéticos de las plantas comparten estructuras y funciones similares con las algas, sin embargo, estos grupos de fotótrofos se han diversificado por millones de años y han desarrollado distintas estrategias para sobrevivir en diferentes ambientes (Falkowski y Knoll, 2007). Los centros de reacción de los fotosistemas son complejos proteico-pigmentarios altamente conservados, con presencia casi exclusivamente de Chl *a*, indicando que existió una fuerte presión selectiva para mantener los genes estructurales de los fotosistemas (Green, 2007; Ganeteg *et al.*, 2004). Por el contrario, las proteínas que conforman los complejos colectores de luz (antena fotosintéticas) pertenecientes a la superfamilia LHC (“Light harvesting complex proteins”) son altamente diversas en algas (Larkum, 2003), por lo que existe una heterogeneidad importante de antenas y las proteínas que las constituyen. El hecho de que los diferentes grupos de fotótrofos tengan diferentes arreglos de antena asociados a pigmentos y proteínas específicas significa que el control y regulación de la DT es diferente entre estos organismos fotosintéticos.

En el grupo algal solo se han reportado homólogos de la proteína PsbS en algas verdes. *Chlamydomonas reinhardtii* posee genes homólogos de la proteína PsbS (Koziol *et al.*, 2007), sin embargo esta proteína no se acumula bajo ninguna condición de estrés (Bonente *et al.*, 2008) y por lo tanto no está involucrada en la regulación de la disipación térmica. Se ha detectado que la proteína LhcSR3 de la familia LHCSR está involucrada en la inducción rápida del NPQ en algas verdes (Peers *et al.*, 2009). La proteína LhcSR3 está asociada a pigmentos (a diferencia de la PsbS) y se ha comprobado que es un sitio de "quenching" de estados excitados de la clorofila a (Bonente *et al.*, 2010). Esta proteína también posee residuos protonables que le permiten actuar como un sensor de pH, al igual que la PsbS en plantas, por lo que se ha propuesto que esta proteína funciona como sensor de pH y puede presentar los sitios de "quenching" (Bonente *et al.*, 2010). Por lo tanto, un solo gen puede estar regulando los componentes principales de la DT en *C. reinhardtii* (Bonente *et al.*, 2010).

Se ha reportado que ortólogos de la familia de proteínas LHCSR se encuentran ampliamente distribuidos en algas verdes y pardas, así como en algunos líquenes (Koziol *et al.*, 2007; Alboresi *et al.*, 2010). Las plantas y las algas verdes parecen emplear distintas proteínas para regular la DT bajo estrés lumínico y se ha documentado que proteínas de la familia LHCSR juegan un papel importante en la regulación de la DT en estas últimas, probablemente con un modo de acción similar a la PsbS (Peers *et al.*, 2009). En *Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum*, dos diatomeas del phylum Heterokontofita, se ha detectado la acumulación de estas proteínas bajo estrés lumínico y se han asociado con la capacidad de fotoprotección (Zhu *et al.*, 2010; Bailleul *et al.*, 2010), sin embargo no se ha determinado a que componente del NPQ está asociada la expresión de estas proteínas. En la diatomea *P. tricornutum* se ha reportado la presencia constitutiva de proteínas LHCSR en células aclimatadas a luz subsaturante (Bailleul *et al.*, 2010). El expresar estas proteínas constitutivamente confiere una capacidad para anticipar cambios en el campo lumínico de un ambiente tan dinámico como el de la columna de agua, por lo que esta capacidad pudo ser una ventaja selectiva de crecimiento a las diatomeas en aguas turbulentas (Bailleul *et al.*, 2010).

Los aspectos mecanísticos del proceso de disipación térmica se han estudiado ampliamente en plantas superiores y en menor grado en algas verdes y diatomeas. El modelo que explica el control de la DT de las plantas es difícil de aplicar para otros grupos de fotótrofos

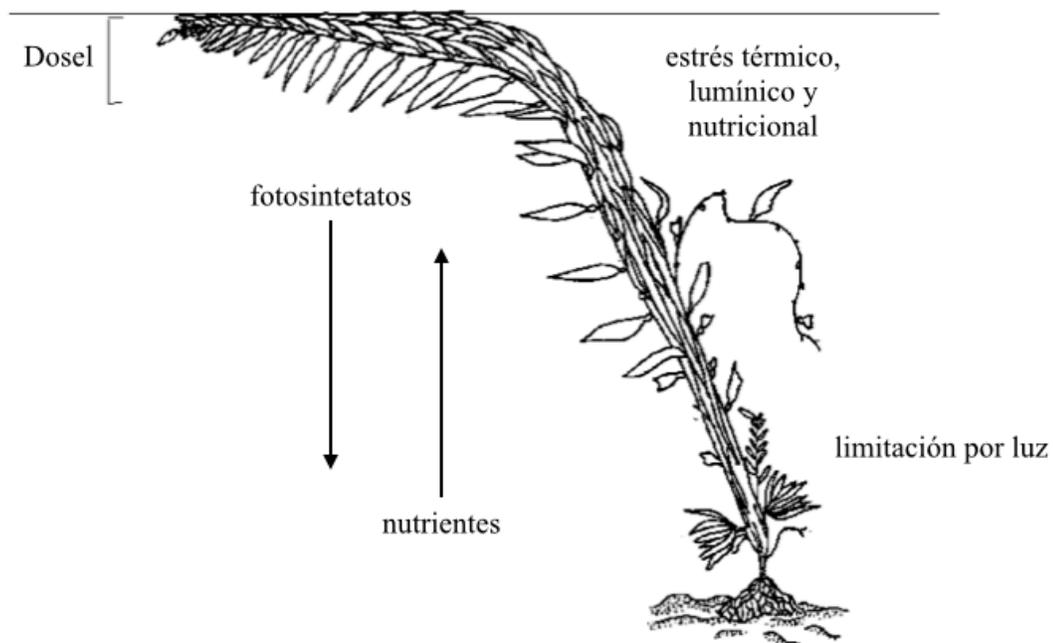
debido a la gran diferencia en los complejos proteico-pigmentarios entre grupos algales con distintas historias evolutivas (Fig. 3).



**Figura 3. Representación esquemática de las respuestas de plantas, líquenes, algas verdes y diatomeas a la luz en exceso. La figura muestra una representación de la membrana tilacoide, el fotosistema II, complejo antena y algunos efectores implicados en el NPQ. En cada cuadro se muestra el tipo de proteína involucrada en el mecanismo de disipación térmica, así como el ciclo de las xantofilas presente en cada grupo. Imagen tomada de Depauw *et al.*, 2012**

### 1.1.2 *Macrocystis pyrifera* como modelo de estudio

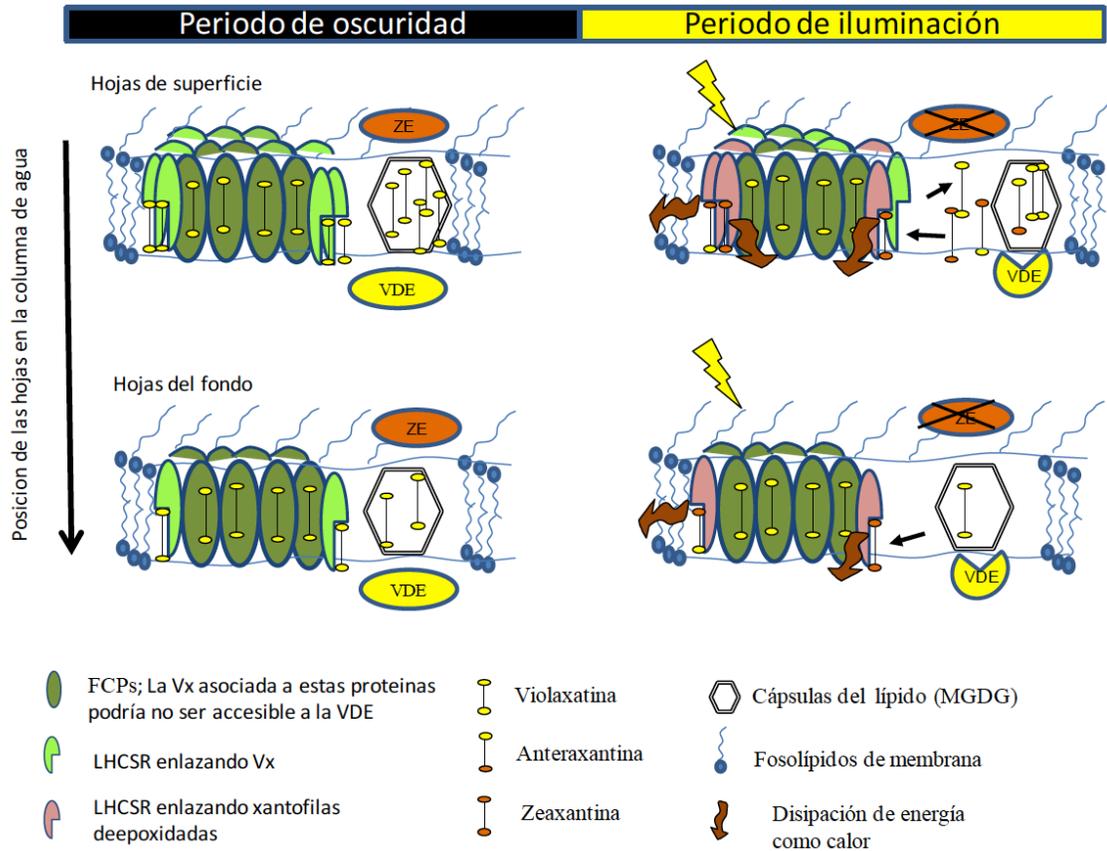
*Macrocystis pyrifera* es la macroalga dominante en las costas rocosas del sistema de la Corriente de California (North 1971), pertenece a la clase Phaeophyceae (algas cafés o pardas), phylum Heterokontofita, y es llamada también sargazo gigante. Esta especie ocupa toda la columna de agua desde profundidades de 30 metros hasta la superficie, formando agregaciones densas conocidas como bosques de "kelp". Presenta tejido fotosintético a lo largo de todo el organismo y está expuesto a un gradiente importante de irradiancia, temperatura y concentración de nutrientes, ya que estas variables cambian con la profundidad (Jackson, 1977; Dean, 1985; Clark *et al.*, 2004) (Fig. 4). Por lo tanto, *M. pyrifera* es una especie que presenta una alta plasticidad fisiológica, ya que expresa diferencialmente mecanismos de fotoaclimatación y fotoprotección de acuerdo a la posición de su tejido fotosintético en la columna de agua (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007).



**Figura 4.** Representación de un organismo adulto de *Macrocystis pyrifera*. Las frondas del dosel pueden experimentar estrés térmico, lumínico y nutricional, mientras que la productividad de frondas inferiores está limitada por luz. Las flechas indican la dirección de translocación de fotosintetatos y nutrientes a lo largo del organismo. Imagen tomada de Colombo-Pallotta, 2006.

Las frondas de la superficie presentan un NPQ alto que pueden duplicar los valores detectados en plantas superiores y algas verdes (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007). Existe muy poca información acerca del control de la fotoprotección en otras algas pardas, pero se han reportado también valores altos de NPQ para *Pelvetia canaliculata* (Harker *et al.*, 1999) y *Laminaria saccharina* (Gevaert *et al.*, 2002). El componente rápido de formación de NPQ (qE) no está presente en *M. pyrifera*, y sólo se han identificado los componentes qZ y qI descritos en plantas superiores, los cuales son dependientes de las reacciones de interconversión del ciclo de las xantofilas (García-Mendoza *et al.*, 2011; Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013). En plantas superiores la aclimatación a altas irradiancias está caracterizada por una disminución del tamaño de la antena y un aumento de la capacidad de fotoprotección para evitar posible daño oxidativo (Müller *et al.*, 2001). En contraste, las frondas de *M. pyrifera* expuestas a altas irradiancias presentan un pool de pigmentos mayor, pero se ha propuesto que no presentan una reducción del tamaño de su antena en comparación a tejido aclimatado a bajas irradiancias (Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013).

Mediante el análisis de la cinética de formación y disipación de NPQ en tejido aclimatado a diferentes condiciones de irradiancia, Ocampo-Álvarez *et al.* (2013) propusieron un modelo conceptual del mecanismo de disipación térmica en *M. pyrifera* (Fig. 5). Este modelo considera un arreglo de las antenas distinto al de plantas superiores, en la cual una proteína de la familia LHCSR es esencial para el control de la DT en *M. pyrifera*. Se propone que en esta proteína se encuentra el sitio de “quenching” debido al potencial de acomplejar los pigmentos del ciclo de las xantofilas que intervienen en este proceso.



**Figura 5. Modelo de control del NPQ en el alga café *Macrocyctis pyrifera*. Se muestra una comparación entre antenas localizadas en la superficie y en estratos profundos de la columna de agua. Las proteínas que contienen fucoxantina (FCP, "fucoxantin-binding proteins") forman oligómeros. Las hojas de superficie tienen una concentración alta de pigmentos del ciclo de las xantofilas compuesto principalmente por violaxantina que es fácilmente accesible a la enzima violaxantina de-epoxidasa. La concentración de proteínas del tipo LHCSR en las hojas de superficie es alto y en consecuencia estas hojas tienen un número mayor de sitios de disipación o "quenching". Tomado de Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013.**

Las proteínas tipo LHCSR son esenciales en el control de la DT en grupos algales filogenéticamente cercanos a las algas pardas y probablemente también juegan un papel clave en estas últimas, por lo que se necesita mayor información bioquímica y estructural sobre las proteínas LHCSR y FCP, así como sobre el arreglo proteico-pigmentario que constituyen para conocer cómo se controla el NPQ en *M. pyrifera*.

## 2. Justificación

---

No se conoce que proteínas intervienen en la DT en algas pardas, sin embargo se ha detectado una transcripción alta de genes que codifican a proteínas de la familia LHCSR en tejido colectado en la superficie (expuesto a alta luz) comparado con tejido colectado a mayor profundidad (Konotchick, 2013). La expresión de algunas de las proteínas que constituyen la familia LHCSR ha sido relacionada con la regulación de los procesos de disipación térmica en algas verdes y diatomeas (Bailleul *et al.*, 2010; Bonente *et al.*, 2010; Mou *et al.*, 2012; Lepetit *et al.*, 2013). Se han identificado sitios protonables y sitios de unión de pigmentos en la estructura de este tipo de proteínas de la antena (Bonente, 2010), por lo que se han propuesto como candidatas del sitio físico en donde se lleva a cabo la disipación térmica del exceso de energía en el FSII, es decir, el sitio activo del NPQ en *M. pyrifera* (Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013). Caracterizar el control molecular del NPQ en algas pardas ayudará a entender cómo evolucionó este proceso en diferentes grupos de organismos fototróficos. Para esto, es necesario primero identificar a las proteínas que intervienen en la DT.

## 3. Objetivo general

---

- Identificar a las proteínas involucradas en la disipación térmica del exceso de energía en el aparato fotosintético de *Macrocystis pyrifera*.

### 3.1 Objetivos particulares

- Caracterizar la expresión diferencial de proteínas de la membrana tilacoide de *Macrocystis pyrifera* en muestras aclimatadas a diferentes irradiancias e identificar proteína (s) con una mayor expresión en muestras aclimatadas a alta luz.
- Evaluar los cambios en la expresión de proteínas de la familia LHCSR (“light harvesting complex stress response”) con el tiempo en muestras de profundidad mantenidas en alta luz y en muestras del dosel mantenidas a baja luz.
- Evaluar la relación entre la expresión de proteínas de la familia LHCSR, la reducción no fotoquímica de la fluorescencia del fotosistema II (NPQ) y concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas en muestras aclimatadas y durante su aclimatación a diferentes irradiancias.

#### 4. Hipótesis

---

Las proteínas pertenecientes a la familia LHCSR están involucradas en la regulación de la disipación térmica del exceso de energía en *Macrocystis pyrifera*.

## 5. Materiales y Métodos

---

### 5.1 Material de estudio

Las muestras de *Macrocystis pyrifera* fueron colectadas en la zona submareal del manto ubicado en la localidad de Campo Kennedy (31°41.96; 116°40.90) cercano a la ciudad de Ensenada, Baja California, México. Se colectaron frondas de organismos adultos y de acuerdo a la aproximación experimental (ver sección 5.6) se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido o fueron transportadas vivas al laboratorio en hieleras con agua de mar del sitio de colecta. El tiempo entre la colecta y el procesamiento de las muestras no excedió las 2 horas.

### 5.2 Extracción de proteínas

Se realizó una comparación entre protocolos de extracción de proteínas diseñados para incrementar la eficiencia de la obtención de extractos de alta calidad en *M. pyrifera*. Cada uno de los protocolos probados en este trabajo se describen a continuación.

#### 5.2.1 Protocolo I (Popovic *et al.*, 1983, modificado)

Tejido fresco de *Macrocystis* se cortó en pequeños pedazos con un bisturí y se lavó con 2 L de agua de mar filtrada (45 µm) a 8 °C utilizando un colador con el fin de eliminar el extracto viscoso. Este procedimiento se repitió 8 veces para remover la mayor parte de mucílago. El buffer de molienda consistió de: sorbitol 1 M, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 mM, EDTA 5 mM, NaNO<sub>3</sub> 2 mM, Na-isoascorbato 2 mM, cisteína 2 mM, BSA 0.2 % (p/v), PVPP 4 % (p/v) y Mes 50 mM (pH 6.1). A continuación el tejido fue lavado 3 veces con 150 mL del buffer anterior a 2 °C. El tejido fue molido en mortero, agregando de forma gradual buffer de molienda hasta alcanzar los 50 mL. El homogenizado generó más desprendimiento de mucílago por lo que el tejido se diluyó en 400 mL de buffer de molienda y posteriormente se pasó a través de 8 capas de cedazo. Los cloroplastos extraídos por este procedimiento fueron sedimentados por medio de centrifugación (7 min, 4°C, 5500 x g). El pellet se resuspendió en 500 µL de buffer de extracción (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, sacarosa 30 %, SDS 2 % y β-mercaptoetanol 5 %), se agitó e incubó 10 min en hielo. Se agregaron 400 µL de fenol (amortiguado con Tris pH 8.0), se agitó e incubó por 10 min. El homogenizado se centrifugó (10 min, 13,000 x g) para separar la fase fenólica, la cual fue transferida a un tubo nuevo. Se agregó 1 mL de una solución de 0.1 M

acetato de amonio en metanol y se dejó incubar por la noche a -20 °C. Las proteínas se recuperaron por centrifugación (5 min, 13,000 x g) y el pellet fue lavado 2 veces con acetato de amonio 0.1 M en metanol y 2 veces más en acetona fría al 80 %. El pellet de proteínas se mantuvo a -20 °C hasta su posterior análisis.

### **5.2.2 Protocolo II** (Nagai *et al.*, 2008)

Inmediatamente después de la colecta en campo, el tejido de *Macrocystis* se lavó con agua destilada y se congeló a -80 °C hasta su procesamiento. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4 °C o en hielo. El tejido se pulverizó en N<sub>2</sub> líquido y se homogenizó en 4 mL de etanol 100 %. El homogenizado se filtró a través de cedazo para remover pedazos de tejido sin pulverizar y se centrifugó 10 min a 17,000 x g (velocidad empleada en todos los pasos de centrifugación subsiguientes). El precipitado se lavó dos veces con etanol 100 % y dos veces con acetona 100 %. El polvo resultante se dejó secar a temperatura ambiente para proceder con la extracción fenólica. El pellet se resuspendió en 500 µL de buffer de extracción (Tris-HCl pH 8.0 0.1 M, sacarosa 30 %, SDS 2 % y β-mercaptoetanol 5 %) y 400 µL de fenol (amortiguado con Tris pH 8.0). La mezcla se agitó por 5 minutos, se centrifugó y la fase fenólica se traspasó a un tubo limpio. Se agregaron 5 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol y se incubó por la noche a -20 °C. Las proteínas fueron recuperadas por centrifugación, se lavaron dos veces con acetato de amonio 0.1 M en metanol y dos con acetona 80 %. El pellet de proteínas se mantuvo a -20 °C hasta su posterior análisis.

### **5.2.3 Protocolo III** (Contreras *et al.*, 2008)

El tejido fresco de *Macrocystis* fue lavado para remover sales en exceso: se lavó cuatro veces con agua Milli Q y cuatro veces con un buffer de Tris-HCl (50 mM pH 8.8), para después ser lavado en baño ultrasónico por 30 s. Una vez que el tejido fue pulverizado en N<sub>2</sub> líquido, éste se resuspendió en 15 mL de buffer de extracción (PVPP 1.5% (p/v), sacarosa 0.7 M, KCl 0.1 M, Tris-HCl 0.5 M (pH 7.5), EDTA 250 mM, 1 tableta de coctel inhibidor de proteasas, β-mercaptoetanol 2 % y CHAPS 0.5 % (p/v). Se agregó un volumen equivalente de fenol (amortiguado con Tris pH 8.0), se homogenizó la mezcla y se incubó 20 min a 4 °C. El homogenizado se centrifugó 20 min a 10,000 x g y se recuperó la fase fenólica. La fase no acuosa fue re-extraída utilizando el mismo volumen de fenol. Las proteínas se precipitaron de la fase fenólica incubando en acetato de amonio 0.1 M en metanol por 3 h a -20 °C. Las proteínas se

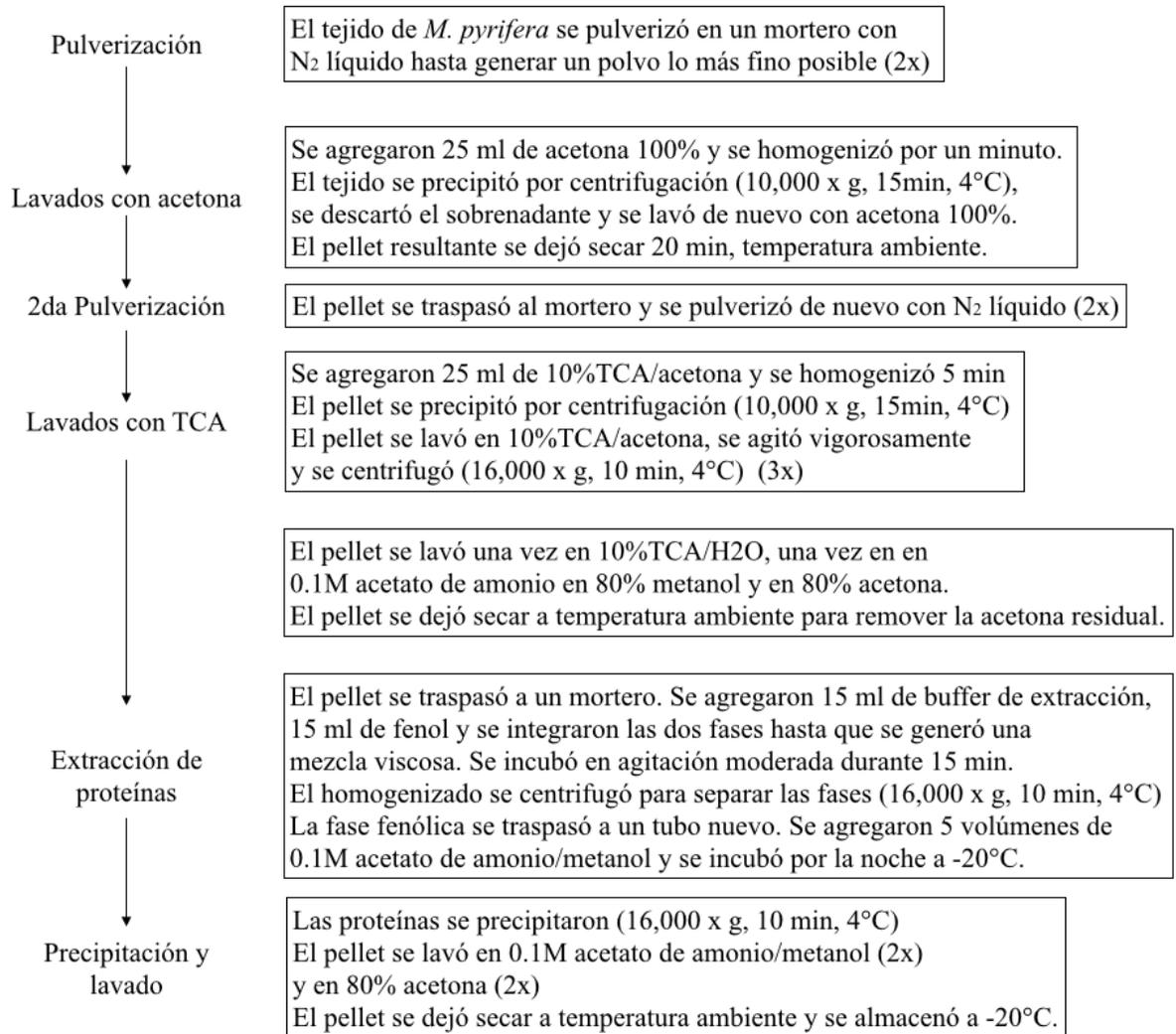
recuperaron por centrifugación y el pellet se lavó siete veces en acetona 80 % fría y una vez en DTT 20 mM en acetona. Los pellets se secaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

#### **5.2.4 Protocolo IV (Wang *et al.*, 2003)**

El tejido fresco de *Macrocystis* fue pulverizado en N<sub>2</sub> líquido, traspasado a microtubos y resuspendido en 2 mL de acetona 100% fría. Después de agitar vigorosamente por 30 s, los tubos fueron centrifugados por 3 min (10,000 x g a 4 °C). El pellet resultante fue lavado con acetona fría una vez más. El pellet se transfirió al mortero y se dejó secar 20 min a temperatura ambiente. El tejido fue pulverizado de nuevo y transferido a un microtubo nuevo. El polvo se lavó 3 veces en TCA/acetona 10 %, una vez en TCA/H<sub>2</sub>O 10 % y dos veces en acetona 80 %. El pellet se deshidrató a temperatura ambiente y se procedió a la extracción fenólica. El pellet se resuspendió en 0.8 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, sacarosa 30 %, SDS 2 % y β-mercaptoetanol 5 %) y 0.8 mL de fenol (amortiguado con Tris pH 8.0). Se agitó vigorosamente durante 30 s y centrifugó 3 min (10,000 x g a 4 °C). La fase fenólica se traspasó a un microtubo limpio y las proteínas se precipitaron durante 30 min en acetato de amonio 0.1 M en metanol. Las proteínas se sedimentaron por centrifugación (10,000 x g a 4 °C). El pellet de proteínas se lavó dos veces en acetato de amonio 0.1 M en metanol y dos veces en acetona 80 %. El pellet fue almacenado a -20 °C hasta su análisis.

#### **5.2.5 Protocolo V (Wang *et al.*, 2003) modificado**

El protocolo V es una modificación del protocolo IV. Se modificó principalmente en los pasos de lavado, en donde se aumentaron algunos pasos con el fin de eliminar la mayor cantidad de componentes recalcitrantes. El protocolo se esquematiza en la Figura 6.



**Figura 6. Diagrama de los pasos implementados para la extracción de proteínas de *Macrocyctis pyrifera* utilizando el protocolo de Wang *et al.*, (2003) modificado (Protocolo V). Se mantuvo una temperatura menor a 4 °C durante todo el proceso de extracción. Todos los buffers y soluciones se utilizan fríos, excepto del fenol. Buffer de extracción: Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, sacarosa 30 %, SDS 2 % y β-mercaptoetanol 5 %.**

## **5.3 Análisis de proteínas**

### **5.3.1 Preparación de las muestras**

Los pellets de proteínas obtenidos de los diferentes protocolos de extracción fueron resuspendidos en buffer de carga 1X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4 % (p/v), glicerol 20 % (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 10 % (v/v), azul bromofenol 0.004 % (p/v)). La concentración de proteínas se determinó por medio del kit comercial *RC DCT*<sup>™</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), el cual permite la cuantificación de proteínas en presencia de agentes reductores y detergentes. Previo a la electroforesis, las muestras fueron incubadas por 1 h a 60 °C y centrifugadas por 3 min a 13,000 x g. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento de carga.

### **5.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (Glicina-SDS-PAGE)**

Las muestras de proteínas fueron analizadas en geles de acrilamida de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles de 12 % y 16 %, así como geles de gradiente de 4-15 % y de 4-20 % dependiendo el propósito de la aproximación experimental. La electroforesis de los geles de 16 % se realizó con un voltaje constante de 100 V durante 3 hrs, mientras que a los de 12 % y los de gradiente se les aplicó un voltaje constante de 200 V durante 40 min, tiempo aproximado en el que el frente del azul bromofenol alcanzó la base del gel.

Al finalizar la electroforesis, las proteínas se tiñeron con una solución de azul de coomassie (azul coomassie R-250 0.1 % (p/v), metanol 40 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v)) durante 2 hrs en agitación suave. El lavado se realizó con una solución para desteñir (metanol 40 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v)) hasta que el gel quedara lo suficientemente transparente y las bandas presentaran contraste suficiente. Finalmente, los geles se lavaron con agua destilada y se documentaron. El procesamiento de las imágenes fue realizado con el software de dominio público ImageJ versión 1.47 (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

### **5.3.3 Inmunodetección de proteínas (Western blot)**

Se detectó la presencia de proteínas específicas por el método de Western blot. La transferencia de proteínas se realizó por medio de la técnica de transferencia húmeda (Towbin *et al.*, 1979) en una cámara húmeda Protean (Bio-Rad), en la que se utilizó una membrana de nitrocelulosa

Trans-Blot Transfer Medium de 0.45  $\mu$ m (Bio-Rad) y el buffer de transferencia Towbin 1X modificado (glicina 192 mM, Tris base 25 mM, SDS 13  $\mu$ M, metanol 20 % (v/v), pH 8.3). La transferencia se llevó a cabo por 50 min a corriente constante de 100 mA.

Una vez que las proteínas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa, se procedió con su inmunodetección empleando los anticuerpos anti-LHCSR, proporcionado amablemente por el Dr. K. Niyogi (UC, Berkeley) y los anti-Fcp2 y Fcp6, proporcionados amablemente por el Dr. E. Rhiel (Carl von Ossietzky University of Oldenburg, Germany). Para ello, la membrana fue incubada toda la noche a 4°C con agitación moderada en TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1 % (v/v), pH 7.6) con leche descremada 5 % (p/v) (Svelty). A continuación la membrana se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente y agitación moderada con los diferentes anticuerpos diluidos 1:500 en TBS-T. La membrana fue lavada tres veces por 15 min con agitación continua en 15 mL de TBS-T y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano) 1:1000 en TBS. La membrana fue lavada tres veces por 15 min en agitación moderada en 15 mL de TBS. Finalmente las proteínas fueron detectadas por medio del sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB, Pierce).

La inmunodetección de proteínas también se llevó a cabo utilizando un kit comercial para detección por medio de fluorescencia de puntos cuánticos, WesternDot® 625 cabra anti-ratón Western blot Kit (Invitrogen). Después de la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa se siguieron las indicaciones del fabricante del kit, el cual proporciona los buffers y el anticuerpo secundario para la detección. Las proteínas detectadas tanto con el sustrato TMB y como por fluorescencia, se documentaron y se cuantificó la densidad de las bandas de interés con el software de dominio público ImageJ versión 1.47 (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

#### **5.4 Medición de fluorescencia de clorofila *a***

La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII fue medida con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada sumergible (Diving-PAM, Walz, Effeltrich, Germany). Las mediciones de fluorescencia en *M. pyrifera* se realizaron en discos de 1.3 cm de diámetro. La fluorescencia se monitoreó colocando la fibra óptica del fluorómetro en un ángulo de 60° en relación al disco. Esta geometría se mantuvo durante el todo el periodo de medición. La nomenclatura y los parámetros calculados es de acuerdo a Van Kooten y Snel (1990). Para las determinaciones de la

eficiencia cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ), el tejido fue adaptado a oscuridad por 10 min y se midió la fluorescencia basal ( $F_0$ ) que es producida solamente por la luz de medición. Asimismo se determinó la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) al aplicar un pulso de luz saturante ( $3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) por un periodo de 0.8 segundos. La fluorescencia variable ( $F_v$ ) es la diferencia entre el valor de  $F_m$  y el valor de  $F_0$ . La  $F_0$  es la emisión del FSII cuando el aceptor primario ( $Q_A$ ) está totalmente oxidado, mientras que  $F_m$  se produce cuando  $Q_A$  está completamente reducido por lo que la energía no puede fluir a través de la vía de la fotoquímica y por lo tanto la fluorescencia es máxima.

La capacidad de disipación no fotoquímica de la fluorescencia de la Chl *a* (NPQ) se midió en discos expuestos por 30 minutos a  $1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , bajo condiciones de temperatura controlada. La geometría se mantuvo constante durante cada medición y se aplicó un pulso saturante cada 30 segundos durante el periodo de inducción de NPQ. El valor de fluorescencia máxima obtenido durante el periodo de incubación con luz actínica corresponde al valor de  $F'_m$ . El NPQ se calculó como:

$$\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (1).$$

### 5.5 Análisis de pigmentos

El análisis y extracción de pigmentos lipofílicos se realizó de acuerdo a Colombo-Pallotta *et al.* (2006). Cada disco de *M. pyrifera* se pulverizó en  $\text{N}_2$  líquido y se homogenizó en 3 mL de acetona fría al 100 %. El extracto se incubó a  $-20^\circ\text{C}$  en oscuridad durante la noche y se clarificó por centrifugación a  $15 \times g$  por 15 min. El sobrenadante se traspasó a un microtubo nuevo y se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  por no más de 24 hrs hasta su análisis. La cuantificación se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC), de acuerdo al protocolo descrito por Van Heukelem y Thomas (2001). Se utilizó una combinación de dos solventes, metanol: TBAA 28 mM (70:30, v/v) como Solvente A y metanol al 100 % como solvente B. El perfil de abastecimiento de solventes fue (% B, min): 5 %, 0 min; 5 %, 5 min; 95 %, 22 min; 95 %, 27 min; 5 %, 30 min. Se detectó la absorción de los pigmentos a una longitud de onda de 436 nm. El equipo de HPLC marca Agilent modelo 1260 estaba equipado con una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C8 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula). El control del equipo,

adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el software ChemStation software (Agilent). El protocolo fue calibrado y los factores de calibración se obtuvieron de estándares puros de clorofilas y carotenoides (DHI, Dinamarca).

El estado de de-epoxidación de los pigmentos involucrados en el ciclo de las xantofilas (DPS) se calculó como:

$$\text{DPS} = ([\text{Ax}] + 0.5 [\text{Zx}]) / \Sigma \text{CX} \quad (2).$$

donde Ax y Zx representan a la anteraxantina y a la zeaxantina, respectivamente. El  $\Sigma \text{CX}$  representa la suma del conjunto ("pool") de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (CX) conformado por violaxantina (Vx), Ax y Zx. El DPS representa el estado fotoprotector de los carotenoides del CX, ya que los pigmentos Ax y Zx están involucrados en la disipación térmica del exceso de energía (Pfündel y Bilger 1994).

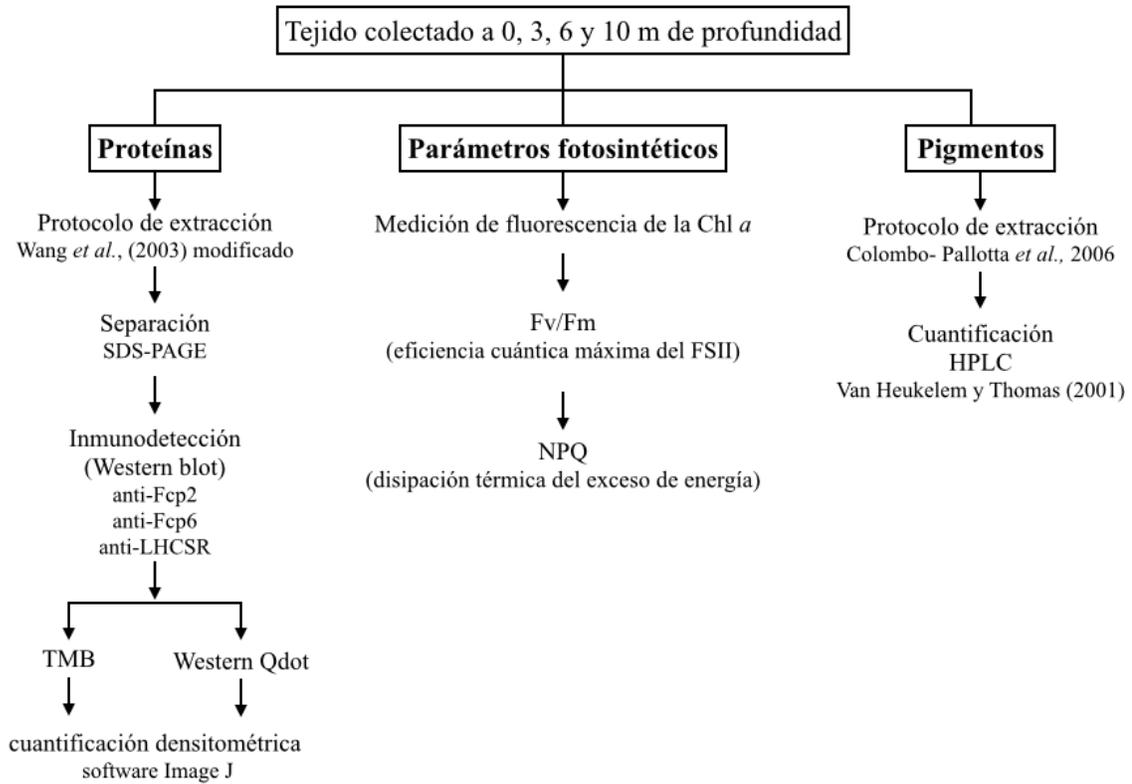
## 5.6 Aproximaciones experimentales

### 5.6.1 Perfil de proteínas, concentración de pigmentos y NPQ en tejido de *Macrocystis pyrifera* aclimatado a diferentes profundidades

Se colectaron frondas de tres organismos adultos de *M. pyrifera* localizadas a 0, 3, 6, y 10 m de profundidad en la columna de agua. Inmediatamente después de la colecta, las frondas se cortaron en cuadros, se etiquetaron, se colocaron en N<sub>2</sub> líquido y fueron transportadas al laboratorio. Las frondas completas colectadas a 0 y 10 m de profundidad fueron transportadas en una hielera con agua de mar al laboratorio en donde se cortaron discos de tejido de 1.3 cm de diámetro y fueron colocados en un incubador con aireación y temperatura constante (17 °C). Se midió la emisión de fluorescencia de la clorofila del FSII por triplicado para los discos de 0 y 10 m de profundidad.

Se evaluaron los perfiles proteicos del tejido colectado a diferentes profundidades y conservadas en N<sub>2</sub> líquido. Se evaluaron también los niveles de expresión de las proteínas detectadas por los anticuerpos anti-LHCSR, anti-Fcp2 y anti-Fcp6 en extractos proteicos de tejido de diferentes profundidades. Se midió la concentración de pigmentos en tejido de 0, 3 y 10 m para determinar la concentración de pigmentos asociados a procesos de fotoprotección. En la

figura 7 se presenta un diagrama de las variables obtenidas de tejido de *M. pyrifera* colectado a diferentes profundidades.



**Figura 7. Protocolos utilizados para evaluar la fisiología fotosintética y la concentración de proteínas y pigmentos en tejido de *Macrocystis pyrifera* colectado a diferentes profundidades de la columna de agua. Las mediciones de Fv/Fm y NPQ solo se realizaron en tejido de 0 y 10 m de profundidad.**

### 5.6.2 Bioensayos de aclimatación

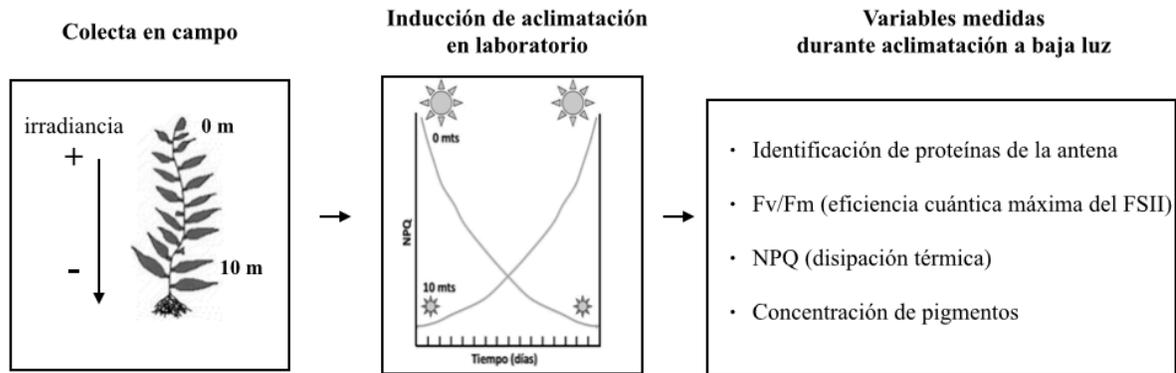
Se colectaron frondas de *M. pyrifera* de 0 y 10 m, fueron etiquetadas y transportadas en oscuridad con agua de mar al laboratorio. Se cortaron discos de 1.3 cm de diámetro de frondas de entre 25 y 35 cm de largo. Los discos se lavaron dos veces con agua de mar filtrada a 17 °C para eliminar el mucílago que desprende el tejido al cortarlo. Los discos se colocaron en matraces dentro de un incubador con temperatura controlada y aireación constante.

Los discos de tejido colectado en superficie, (aclimatado a alta irradiancia), se transfirieron a condiciones artificiales de baja luz, tratamiento que fue llamado tratamiento de aclimatación a baja luz (BL) (Fig. 8). Por otro lado, el tejido colectado a 10 m de profundidad

(aclimatado a bajas irradiancias) fue transferido a condiciones artificiales de alta luz, llamado tratamiento de inducción de aclimatación a alta luz (AL) (Fig. 8).

La duración e intensidad de luz a la cual fueron expuestos los discos durante los periodos de aclimatación fueron variables entre bioensayos. Se realizaron una serie de bioensayos prospectivos para evaluar el tiempo de incubación (horas o días) necesario para generar una respuesta fotoaclimatativa en tejido de *M. pyrifera*. Las incubaciones en la escala de horas no generaron respuestas de aclimatación, de acuerdo a los parámetros fotosintéticos medidos (NPQ y Fv/Fm) durante este periodo (1-6 horas). Se observaron cambios en la capacidad de NPQ en incubaciones mayores a un día, por lo que se presentan los 3 experimentos con los periodos de incubación más largos en los que se caracterizó la respuesta de fotoaclimatación y fotoprotección. El bioensayo I tuvo una duración de 5 días y la irradiancia de los tratamientos AL y BL luz fue de 600 y 150  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente. El bioensayo II tuvo una duración de 6 días y se utilizaron las mismas intensidades de luz que en el bioensayo I. El bioensayo III tuvo una duración de 8 días y las irradiancias usadas en los tratamientos de AL y BL fueron de 1000 y 100  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente. La irradiancia de incubación utilizada en los bioensayos de aclimatación a AL fue 5 a 10 veces mayor que la irradiancia de saturación caracterizada en tejido de *M. pyrifera* colectado a 10 m de profundidad (Colombo-Pallota *et al.*, 2006), lo que asegura que la actividad fotosintética de este tejido no está limitada por luz y por el contrario, este recurso se encuentra en exceso. La irradiancia utilizada en los bioensayos de aclimatación a BL fue aproximadamente 10 veces menor a los niveles de luz detectados en el dosel de *M. pyrifera*. Estos niveles de irradiancia son menores a la irradiancia de saturación detectada en tejido superficial (Colombo-Pallotta *et al.*, 2006), induciendo por lo tanto, una aclimatación fisiológica a condiciones de BL.

Durante el periodo de aclimatación se midió la capacidad de NPQ. Las mediciones se llevaron a cabo diariamente, siempre a la misma hora por la mañana, de acuerdo a la técnica de medición de fluorescencia descrita en el apartado 5.4. Las mediciones se realizaron por triplicado. Asimismo, se tomaron muestras por triplicado para medir la concentración de pigmentos previo y posterior a cada inducción de NPQ. Durante el periodo de aclimatación también se tomaron muestras para evaluar la expresión de proteínas de las antenas que conforman el aparato fotosintético y analizar posibles cambios de su expresión durante este periodo.



**Figura 8.** Representación esquemática de los pasos realizados para llevar a cabo los bioensayos de aclimatación. (1) Colecta en campo de tejido aclimatado a alta (0 m) y baja (10) luz. (2) Inducción de aclimatación de tejido de 0 m a baja luz y tejido de 10 m a alta luz. (3) Variables medidas durante el Bioensayo III (aclimatación de tejido colectado a 0 m y expuesto a baja luz durante un periodo de 8 días).

### 5.7 Análisis estadísticos

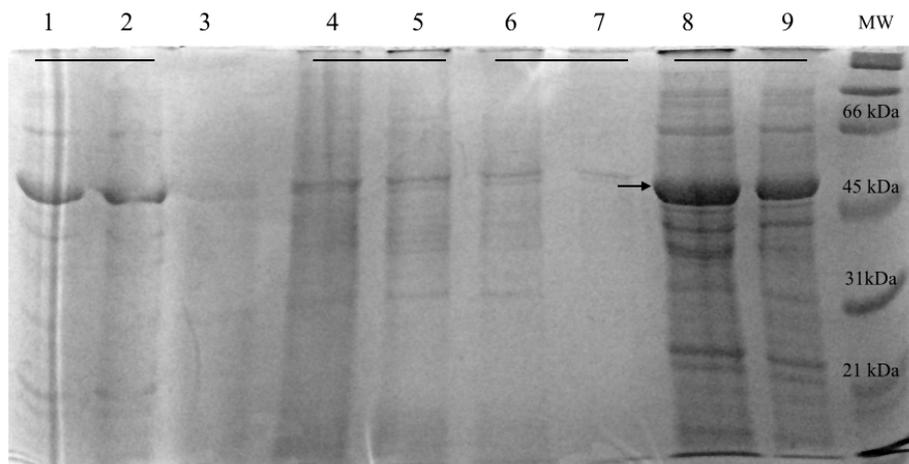
Las comparaciones entre los parámetros de diferentes profundidades y tratamientos de aclimatación fueron realizados por medio de una prueba t-Student utilizando el programa STATISTICA™ (Versión 7.1). En todos los casos el valor de significancia fue de 0.05.

## 6. Resultados

---

### 6.1 Comparación de métodos de extracción de proteínas totales

*Macrocystis pyrifera* posee un alto contenido de componentes recalcitrantes que impiden la obtención de extractos de proteínas de buena calidad por lo que se probaron cuatro protocolos que utilizan fenol como agente solubilizante y una posterior precipitación de proteínas con metanol y acetato de amonio. Los 4 métodos evaluados se describen a detalle en materiales y métodos. La calidad de los extractos proteicos de tejido de *M. pyrifera* se evaluó por medio de geles desnaturalizantes (Glicina-SDS-PAGE) (Fig. 9).



**Figura 9.** Separación de proteínas mediante SDS-PAGE al 12%. Los carriles 1 y 2 corresponden al protocolo III; los carriles 4 y 5 al protocolo II y los carriles 6 a 7 al protocolo I. Se realizó la extracción en tejido fresco de *Macrocystis pyrifera*. Los carriles 8 y 9 son proteínas extraídas de tejido fresco de la planta *Ficus benjamina* mediante el protocolo II. La flecha indica la banda que probablemente corresponde a la subunidad grande de Rubisco. Cada uno de los protocolos de extracción está representado por dos extractos independientes (carriles adyacentes).

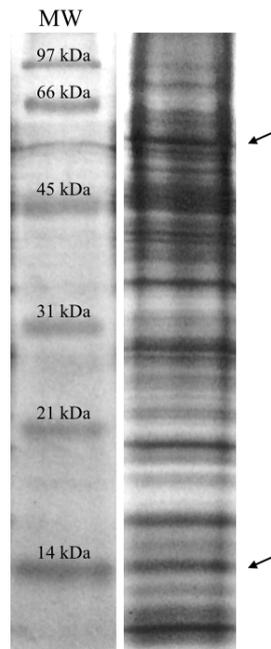
Como se observa en la figura 9, ninguno de los tres protocolos evaluados resultaron en una extracción adecuada en tejido fresco de *M. pyrifera*, ya que se detectó un número bajo de proteínas (pocas bandas) así como una baja concentración en las proteínas extraídas (densidad baja de las bandas). Se observa una mayor abundancia de proteínas con un peso molecular mayor a los 31 kDa. La proteína de mayor concentración con un peso molecular aproximado de 50 kDa, es probablemente la proteína más abundante en células vegetales, la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).

Se detectaron pocas bandas por debajo de los 31 kDa. Estos resultados indican que los protocolos fueron inadecuados para extraer proteínas de bajo peso molecular en *M. pyrifera*, ya sea que no se extrajeron en lo absoluto o que se perdieron en los pasos de lavado del homogenizado. Con tejido no recalcitrante (*Ficus benjamina*) se obtuvo un extracto más complejo y de mejor calidad, particularmente con el protocolo II, ya que se extrajo un mayor número de proteínas y a mayor concentración con respecto a los protocolos I y III (datos no mostrados).

El protocolo II, es un método modificado del reportado por Wang *et al.*, 2003, en el cual se utiliza acetona y no etanol en los primeros pasos de limpieza del tejido, además se utiliza ácido tricloroacético como agente precipitante de las proteínas en los pasos de lavado. Se probó el protocolo de Wang *et al.*, 2003 (denominado como protocolo IV) en *M. pyrifera*. Se obtuvo una extracción de proteínas mayor que con los protocolos I al III, sin embargo la concentración de proteínas (evaluada por medio de la intensidad de las bandas) continuó siendo baja. La abundancia de bandas por debajo de los 25 kDa fue también baja (resultados no mostrados).

Ya que proteínas menores 30 kDa son las de interés en el presente estudio se realizaron varias modificaciones al protocolo IV con el objetivo de aumentar la eficiencia de extracción de proteínas de este peso molecular tomando en cuenta la naturaleza altamente recalcitrante del tejido de *M. pyrifera*, , Una de las principales modificaciones al protocolo IV fue el escalamiento de la cantidad de tejido procesado y por lo tanto del volumen de extracción, así como el tipo de lavados para eficientizar la sedimentación de las proteínas. Se procesaron 5 gramos de tejido y se emplearon volúmenes de hasta de 50 mL durante el proceso de lavado y extracción de proteínas. Otra modificación importante fue el aumento de pasos de ruptura mecánica del tejido, ya que se implementaron 2 pasos de pulverización con nitrógeno líquido. Esto aumentó el rompimiento de tejidos y lisis celular por lo que se elevó la cantidad de proteínas extraídas y eliminación de compuestos recalcitrantes durante los pasos de lavado. Otra modificación fue incluir un paso de fraccionamiento salino ("salting out") en la etapa de lavados, aumentando la precipitación de proteínas y disminuyendo en gran medida la co-precipitación de compuestos que interfieren en la extracción fenólica. El método Wang *et al.*, 2003 modificado (protocolo V) se describe a detalle en materiales y métodos.

De los protocolos probados, el V fue el más eficiente para la extracción de proteínas totales en *M. pyrifera*. Con este protocolo se obtuvo el mayor número de bandas y con una definición adecuada en los geles desnaturalizantes (Fig. 10). Por lo tanto, el protocolo de Wang *et al.*, 2003 modificado (V) fue el que se utilizó para caracterizar el perfil de proteínas en tejido de *M. pyrifera* aclimatado a diferentes condiciones ambientales.

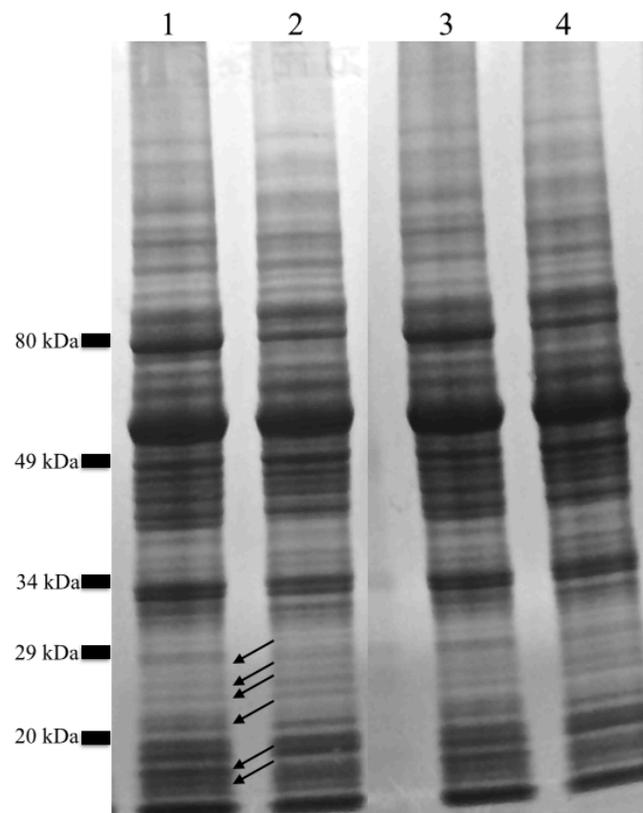


**Figura 10.** Separación de proteínas mediante SDS-PAGE al 15%. Extracto de proteínas totales de tejido fresco de *Macrocyctis pyrifera* extraído mediante el protocolo V (ver materiales y métodos). Las flechas indican la presencia probable de la subunidad grande (55 kDa) y chica (14 kDa) de Rubisco.

## 6.2 NPQ y concentración de proteínas y de pigmentos en tejido de *M. pyrifera* colectado a diferentes profundidades

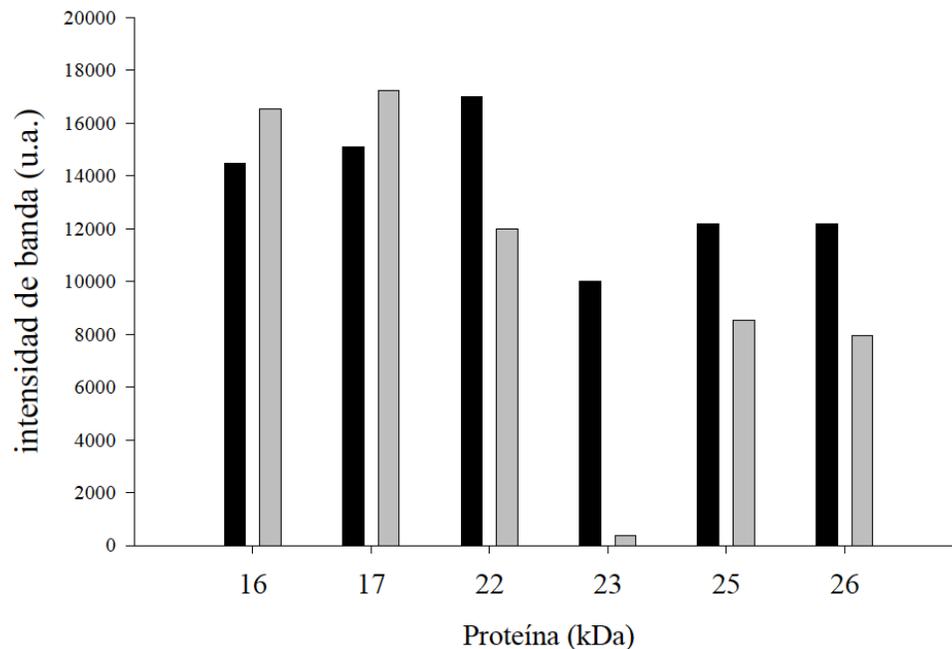
### 6.2.1 Comparación de perfiles de proteínas en tejido colectado a diferentes profundidades.

Con el objetivo de evaluar una posible expresión diferencial de proteínas en tejido de *M. pyrifera* aclimatado a diferentes condiciones lumínicas se caracterizaron los perfiles proteicos de frondas colectadas a dos profundidades la columna de agua. En la figura 11 se muestran los perfiles de proteínas obtenidos de frondas colectadas a 0 y 10 metros de profundidad. Se observa un patrón de bandas similar en muestras de ambas profundidades, sin embargo se observan diferencias claras en la densidad de algunas bandas en el intervalo de tamaño de proteínas que conforman las antenas pigmentarias.



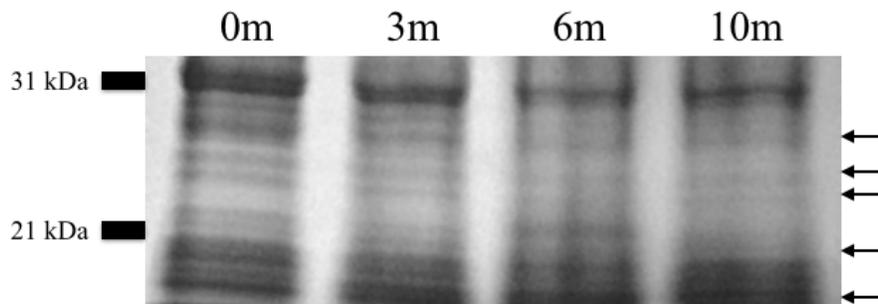
**Figura 11.** Perfil de proteínas de *Macrocyctis pyrifera* separadas mediante SDS-PAGE de gradiente 4-20%. Los carriles 1 y 3 corresponden a tejido colectado a 10 m de profundidad; los carriles 2 y 4 corresponden a tejido colectado en superficie. Se presentan los resultados de dos muestras independientes. Las flechas indican bandas en el intervalo de tamaño de proteínas que conforman las antenas pigmentarias con cambios en densidad entre profundidades. Se cargó la misma concentración de proteínas (110 µg por carril) para todas las muestras. Se presenta un resultado de un solo muestreo pero se obtuvieron resultados similares en experimentos independientes.

Las proteínas que conforman los complejos antena de la maquinaria fotosintética poseen un peso molecular entre los 16 y 30 kDa, intervalo dentro del cual se encuentran los cambios en expresión antes mencionados. Se realizó la cuantificación de bandas en las que se observaron cambios de intensidad entre perfiles de 0 y 10 m de profundidad (Fig. 12). Se observó un aumento de densidad del 25 % de dos bandas con pesos moleculares de aproximadamente 25 y 26 kDa en muestras de superficie con respecto a frondas colectadas a 10 m de profundidad. Asimismo, se observa que una proteína con un tamaño de aproximadamente 22 kDa presentó un aumento promedio de expresión del 20 % en tejido de superficie. En contraste, se observa que algunas proteínas presentaron una menor expresión o están ausentes en tejido de superficie. La banda correspondiente a los 23 kDa desaparece en muestras de superficie mientras que la densidad de las bandas de 16 y 17 kDa disminuyó aproximadamente un 10 y 5 %, respectivamente.



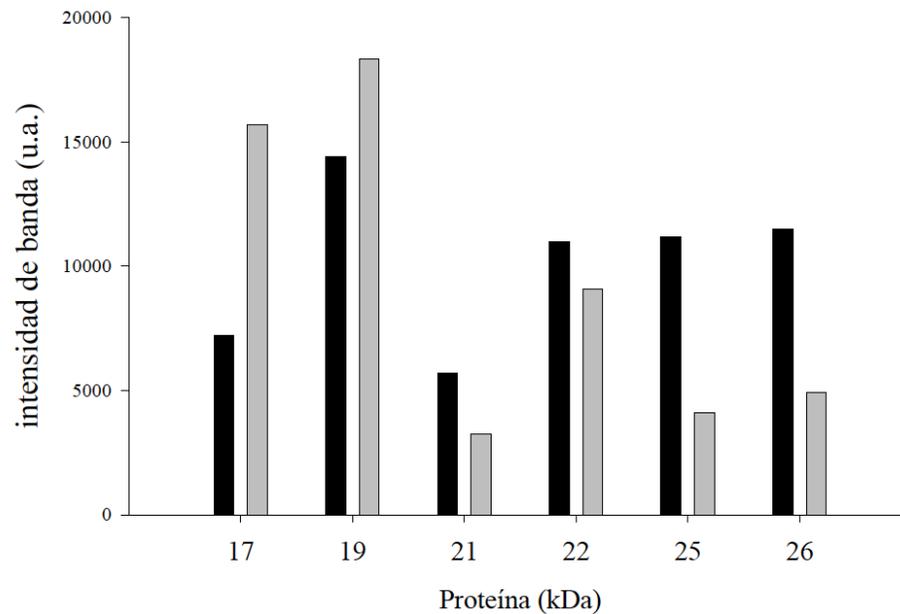
**Figura 12.** Cuantificación de la intensidad de banda, expresada en unidades arbitrarias, correspondiente a proteínas en el intervalo de los 16 a los 26 kDa, en las que se detectaron cambios de concentración entre perfiles proteicos de tejido colectado a 0 m (barras negras) y 10 m (barras grises) de profundidad. La cuantificación densitométrica corresponde a proteínas separadas mediante SDS-PAGE de gradiente 4-20%.

Posterior a la comparación de dos profundidades en las que se esperaban respuesta contrastantes de acuerdo a la fisiología y características descritas en trabajos previos (Colombo-Pallotta *et al.*, 2006; García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2006; Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013), se compararon los perfiles de proteínas de tejido colectado a 0, 3, 6 y 10 m de profundidad. Se detectó una expresión diferencial de proteínas similar a la observada en los perfiles de 0 y 10m, con una disminución gradual de la densidad de las bandas de los 21, 22, 25 y 26 kDa con la profundidad (Fig. 13).



**Figura 13.** Perfil de proteínas de tejido de *Macrocyctis* separadas por SDS-PAGE al 15% (17-32 kDa). Se comparan los perfiles proteicos de tejido colectado a 0, 3, 6 y 10 metros de profundidad. Las flechas indican las bandas con cambios en densidad entre las diferentes profundidades. Se cargó la misma concentración de proteínas (100 µg por carril) para todas las muestras. Se presenta un resultado de un solo muestreo pero se obtuvieron resultados similares en experimentos independientes.

Específicamente, se observa una reducción importante de la concentración de la proteína con un peso aproximado de 21 kDa en las muestras de superficie conforme aumenta la profundidad. La banda de 21 kDa no se detecta en el perfil proteico de las frondas colectadas a 10 m. Por otro lado, se observó un aumento de expresión con la profundidad de proteínas entre los 17 y 19 kDa. La banda correspondiente a los 17 kDa presentó un aumento del 50 % en la intensidad de banda del perfil de 10 m con respecto al superficial (Figura 14).



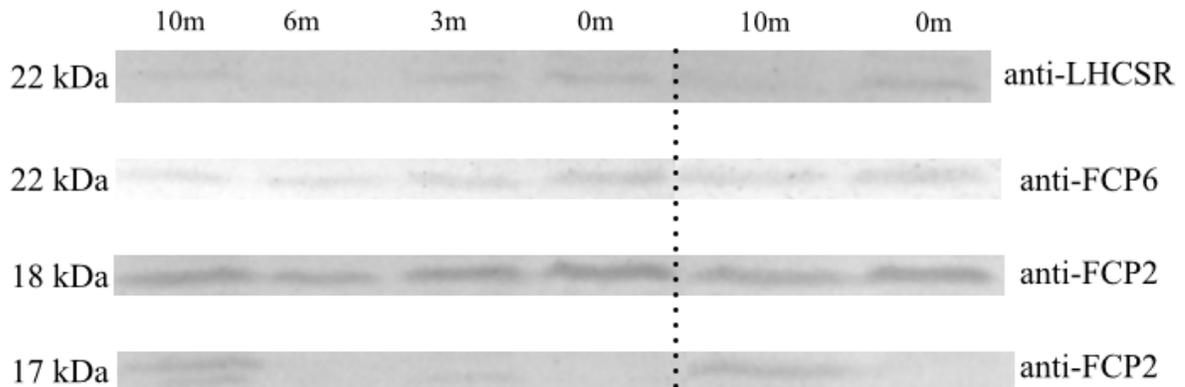
**Figura 14.** Cuantificación de la intensidad de banda expresada en unidades arbitrarias, correspondiente a proteínas en el intervalo de los 17 a los 26 kDa, en las que se detectaron cambios de concentración entre perfiles proteicos de tejido colectado a 0 m (barras negras) y 10 m (barras grises) de profundidad. La cuantificación densitométrica corresponde a proteínas separadas mediante SDS-PAGE al 15 %.

### 6.2.2 Ensayos de inmunodetección

Se evaluaron los niveles de expresión de proteínas que conforman las antenas asociadas al FSII en tejido de *M. pyrifer*, colectado a diferentes profundidades en la columna de agua por medio de inmunodetección (Western Blot). Se utilizaron tres anticuerpos contra antígenos proteicos específicos: el anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2. La detección del reconocimiento de proteínas por estos anticuerpos se realizó mediante la reacción cromogénica del sustrato tetrametil bencidina (TMB) y mediante la emisión de fluorescencia de puntos cuánticos (Qdot Western blotting kit, Invitrogen).

En la figura 15 se presentan las bandas inmunodecoradas con los diferentes anticuerpos detectados por medio del sustrato TMB. Los anticuerpos utilizados reconocieron proteínas con un peso molecular entre los 17 y 22 kDa aproximadamente. El anti-LHCSR y el anti-FCP6 reconocieron a una misma proteína con un tamaño de aproximadamente 22 kDa. Esta proteína y una de 17 kDa, reconocida por el anti-FCP2, presentaron una expresión diferencial con respecto a

la profundidad. El anti-Fcp2 reconoció también a otra proteína con un peso molecular de 18 kDa que presentó la misma abundancia en las muestras colectadas a diferentes profundidades.

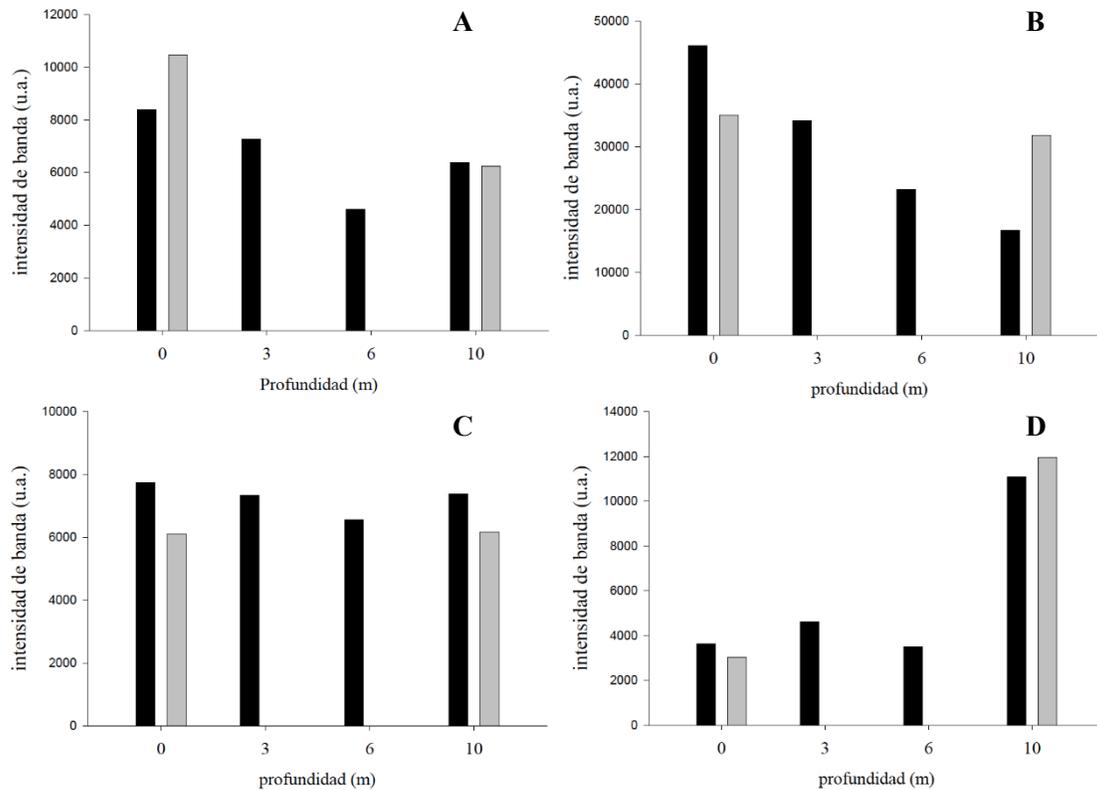


**Figura 15. Inmunodetección de proteínas de frondas de *Macrocyctis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades con los anticuerpos anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2. La detección de anticuerpos se llevó a cabo por medio del sustrato TMB. Se cargó la misma concentración de proteínas (100 µg por carril) para todas las muestras. Se presenta resultados de un solo muestreo pero se obtuvieron resultados similares en experimentos independientes.**

Se cuantificó la intensidad de la densidad de las bandas inmunodetectadas. Se observó una disminución importante con la profundidad de la concentración de la proteína de un peso de 22 kDa aproximadamente. Se detectó una disminución del 24 y 41 % (replica 1 y replica 2, respectivamente) en la expresión de la proteína reconocida por el anti-LHCSR en frondas de 10 m con respecto a las de superficie (Fig. 16). La expresión de esta proteína a 3 m fue 5 % menor con respecto a la de superficie, mientras que a 6 m se detectó una disminución del 45 % con respecto a la expresión en tejido colectado a 0 m. Asimismo, se detectó una expresión menor de la proteína reconocida por el anti-Fcp6 en profundidad en comparación con frondas de superficie, ya que los niveles de expresión disminuyeron en un 64 y 10% (replica 1 y replica 2 respectivamente) en tejido de 10 metros. La expresión de esta proteína disminuyó gradualmente con profundidad. Se observó una disminución gradual con profundidad en la proteína detectada por el anti-Fcp6 de los perfiles proteicos de 0, 3, 6 y 10 m.

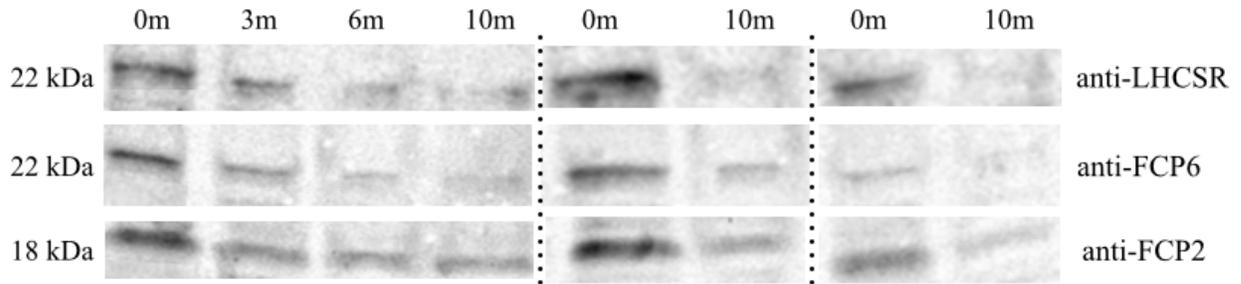
El anticuerpo anti-Fcp2 reconoció dos proteínas (18 y 17 kDa) que presentaron diferentes patrones de expresión. La concentración de la proteína de 18 kDa fue similar en todas las profundidades, con un ligera disminución del 2 y 5 % (replica 1 y replica 2, respectivamente) en

frondas de 10 m con respecto a las de superficie. En contraste, se detectó un incremento de aproximadamente 75 % en tejido de profundidad con respecto al de superficie para la proteína con un peso de 17 kDa. Esta fue la única proteína detectada por los anticuerpos que presentó una sobreexpresión en frondas de 10 m en comparación con las de 0, 3 y 6 m de profundidad.



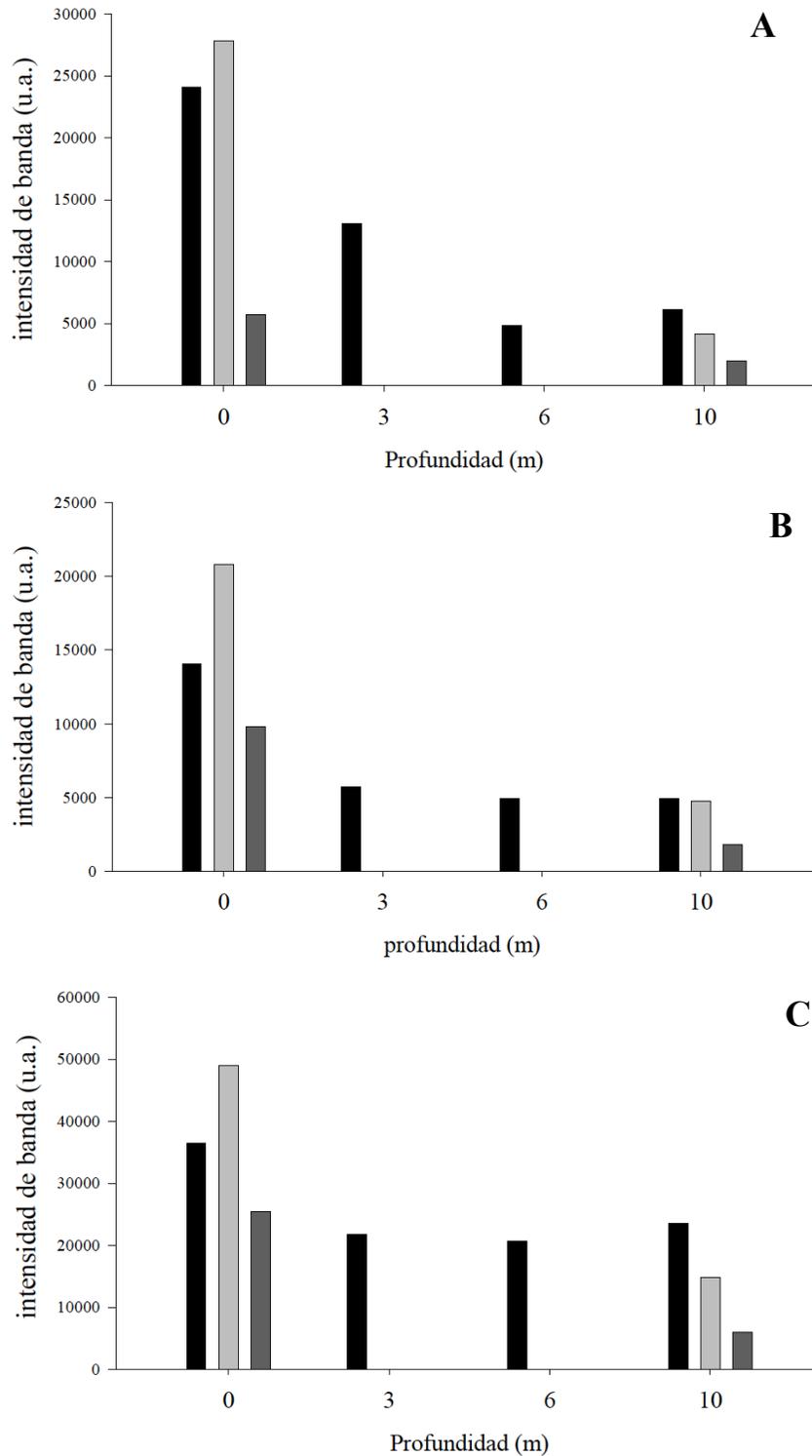
**Figura 16.** Cuantificación de la intensidad de banda, expresada en unidades arbitrarias, correspondiente a las proteínas reconocidas por los anticuerpos (A) anti-LHCSR, (B) anti-Fcp6, (C) anti-Fcp2 y (D) anti-Fcp2 de tejido colectado a 0, 3, 6 y 10 m de profundidad. Se realizó la cuantificación por duplicado en muestras colectadas a 0 y 10 m de profundidad (barras grises).

El reconocimiento de proteínas con los anticuerpos utilizados y detectados por medio de fluorescencia utilizando el kit comercial Western Qdot fue inespecífico. En el intervalo de los 10 a los 30 kDa se detectaron varias bandas que no corresponden al tamaño de las proteínas reconocidas por los anticuerpos en el ensayo anterior. Asimismo, el tamaño de estas proteínas no corresponde con las FCPs o LHCSRs reportadas para diatomeas (Westerman y Rhiel, 2005; Lavaud, 2007; Zhu y Green, 2010), por lo tanto, se presenta las bandas cuyo peso molecular coincide con las proteínas antígeno para cada anticuerpo y reconocidas por estos en el ensayo anterior (Fig. 17). No se presenta la proteína de tamaño aproximado de 17 kDa reconocida por el anti-Fcp2 y detectada con TMB, ya que debido a la alta señal de fluorescencia generada alrededor de dicho peso molecular no fue posible la cuantificación individual de la banda.



**Figura 17. Inmunodetección con anticuerpos anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2 de extractos proteicos de frondas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. La detección de anticuerpos se llevó a cabo por medio del kit comercial Western Qdot. Las muestras fueron cargadas en base a la concentración de proteínas (100 µg por carril). Se presentan el resultado de tres muestras independientes colectadas a 0 y 10 m de profundidad. Se obtuvieron resultados similares en experimentos independientes.**

Los cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas de 22, y 18 kDa se presenta en la figura 18. La proteína de 22 kDa detectada por el anticuerpo anti-LHCSR presentó una concentración de un 66 % al 85 % (mínimo y máximo cuantificado) menor en frondas de 10 m en comparación a las de superficie. Asimismo, se observó una disminución de la concentración con en el gradiente de profundidad de 0 a 10 m. La misma proteína de 22 kDa reconocida por el anti-Fcp6 presentó una concentración de 3 a 5 veces más alta en superficie que en las frondas de 10 m. En contraste con el resultado del reconocimiento de las proteínas con los anticuerpos y detección por medio de TMB, con el anti-Fcp2 y detección Western Qdot se observó una disminución en la concentración de la proteína de 18 kDa de hasta un 77 % en tejido de profundidad.



**Figura 18.** Cuantificación de la intensidad de banda expresada en unidades arbitrarias, correspondiente a las proteínas reconocidas por los anticuerpos (A) anti-LHCSR, (B) anti-Fcp6, (C) anti-Fcp2 de tejido colectado a 0, 3, 6 y 10 m de profundidad. Se presenta la cuantificación de tres replicas en muestras colectadas a 0 y 10 m de profundidad (barras grises).

### 6.2.3 Concentración de pigmentos y NPQ de tejido colectado a diferentes profundidades

Se cuantificó la concentración de pigmentos en las muestras colectadas a 0, 3, 6 y 10 m de profundidad (Fig. 19). La concentración de los pigmentos fucoxantina y chl *c*, aumentó un 15 % y 35 % respectivamente, en las frondas de profundidad (6 y 10 m) en comparación con las de superficie. El  $\beta$ -caroteno disminuyó con la profundidad hasta en un 50 % en frondas de 10 m con respecto a las de superficie, misma tendencia que se observó en la concentración de violaxantina, la cual disminuyó hasta en un 70 % en hojas de 10 m.

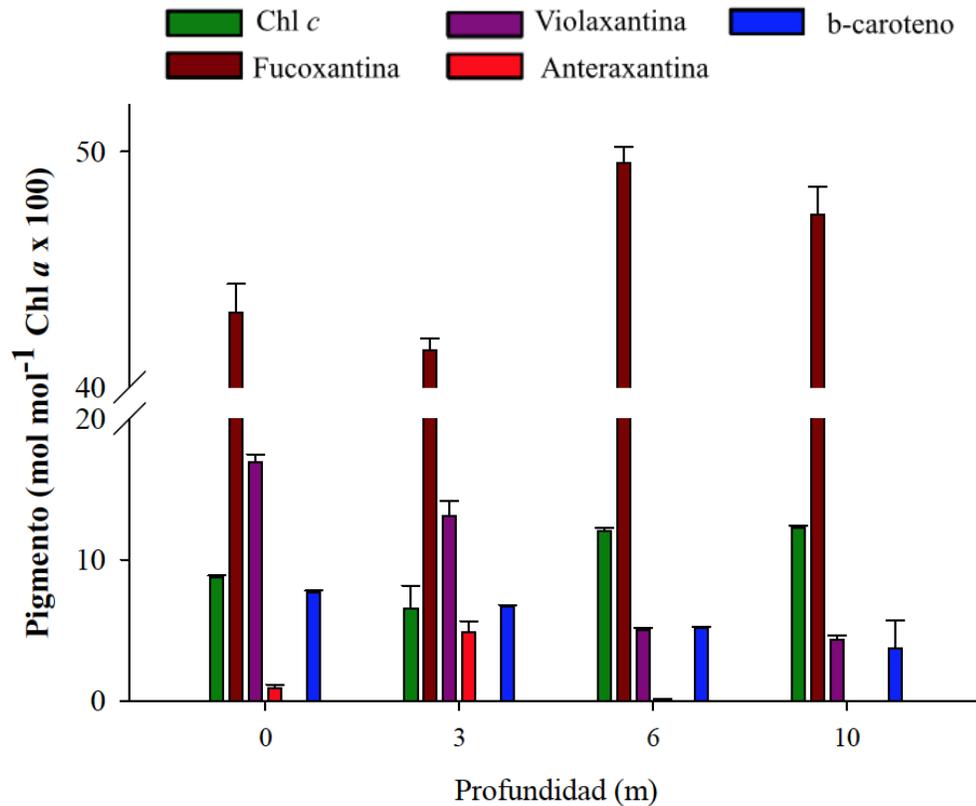


Figura 19. Concentración de pigmentos en frondas de *Macrocyctis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades en la columna de agua. La concentración de los pigmentos se normalizó con respecto a la concentración de Chl *a* y se presenta en mol de pigmento por mol<sup>-1</sup> Chl *a* x 100. Se presenta el promedio de 3 muestras  $\pm$  su desviación estándar.

La anteraxantina se detectó únicamente en tejido superficial de 0 y 3 m, mientras que la zeaxantina no se detectó en ninguna de las profundidades. El conjunto (“pool”) de pigmentos del ciclo de las xantofilas ( $\Sigma$ CX) disminuyó un 70 % en tejido de 10 m en comparación con los de superficie (Tabla I). El estado de de-epoxidación (DPS) del pool del ciclo de las xantofilas fue 0 a

10 m mientras que en frondas de 3 m fue de 13.3 (Tabla I), el cual estuvo asociado principalmente a la presencia de anteraxantina.

**Tabla I Concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas en frondas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades en la columna de agua.**

Profundidad (m)	Vx	Ax	Zx	$\Sigma$ CX	DPS	NPQ
0	16.9±0.5	0.9±0.2	n.d.	17.8±0.0	2.4±0.6	8.3
3	13.07±1	4.8±0.7	n.d.	17.9±1.5	13.3±1.4	
6	5±0.1	0.07±0.0	n.d.	5.1±0.1	0.7±0.6	
10	4.3±0.2	n.d.	n.d.	4.3±0.2	0.0	2.6

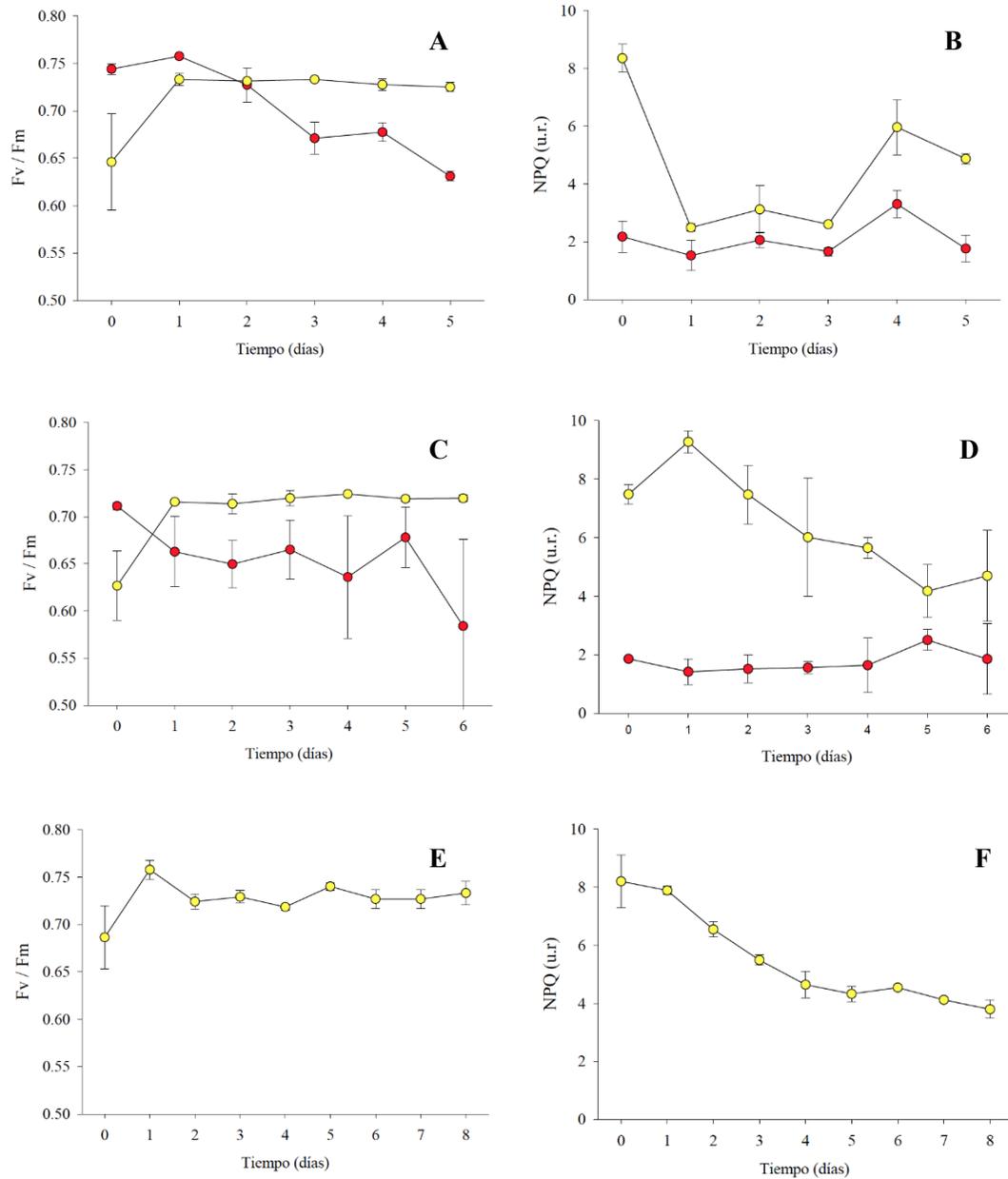
La concentración de los pigmentos involucrados en el ciclo de las xantofilas (CX), violaxantina (Vx), anteraxantina (Ax) y zeaxantina (Zx) se presenta en mol de pigmento por mol<sup>-1</sup> Chl *a* x 100. El tamaño del pool de las xantofilas ( $\Sigma$ CX) es la suma de [Vx]+[Ax]+[Zx]. El DPS está expresado como ([Ax\*0.5]+[Zx]/ $\Sigma$ CX) x100. Se presenta el promedio de tres muestras ± su desviación estándar. n.d., por debajo del límite de detección del método de cuantificación.

### **6.3 Cambio en la concentración de pigmentos, expresión de NPQ y proteínas en tejido de *M. pyrifera* aclimatado a diferentes irradiancias**

Se evaluaron los cambios de algunas de las respuestas fotoadaptativas en tejido de *M. pyrifera* colectado en superficie (aclimatado a alta luz) e incubado a baja luz (tratamiento BL). Por otro lado, el tejido colectado a 10 m de profundidad (aclimatado a baja luz) se incubó a una irradiancia alta (tratamiento AL). Los niveles de irradiancia para cada uno de los tratamientos BL y AL se especifican en cada uno de los bioensayos descritos a continuación.

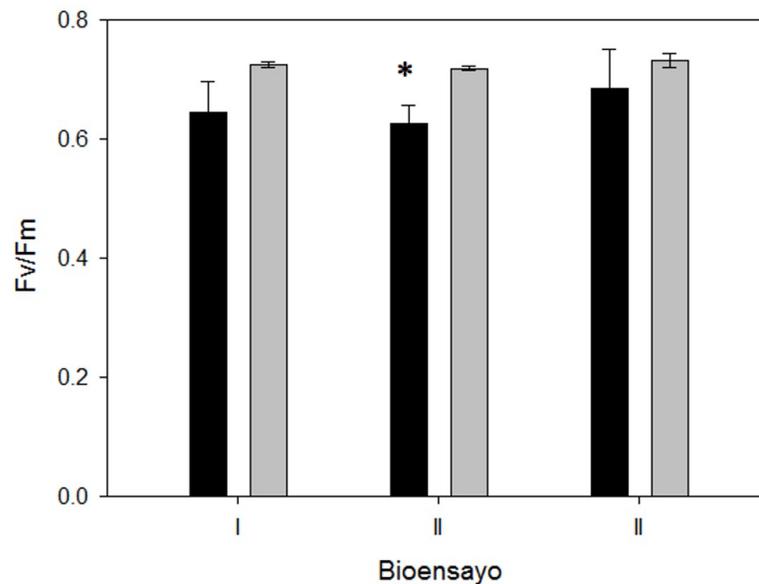
#### **6.3.1 Variación de Fv/Fm y NPQ en tejido expuesto a diferentes irradiancias**

Se realizaron un total de 6 bioensayos independientes. Se presentan los resultados de 3 bioensayos como representativos de las tendencias observadas. En la figura 20 se muestra la variación del NPQ y Fv/Fm durante el periodo de aclimatación. Los bioensayos I, II y III tuvieron una duración de 5, 6 y 8 días respectivamente. En el Bioensayo I y II el tejido aclimatado a AL estuvo expuesto a  $600 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mientras que la aclimatación a baja luz se realizó con  $150 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En el bioensayo III se modificaron las irradiancias de aclimatación: el tejido aclimatado a BL se incubó a  $100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que en tejido aclimatado a AL la irradiancia aumentó a  $1000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Figura 20.** Variación de la eficiencia cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ) (A, C, E) y del quenching no fotoquímico de la emisión de fluorescencia (NPQ) (B, D, F) durante el periodo de aclimatación a alta (AL) y baja (BL) luz. Los círculos rojos corresponden a tejido colectado a 10 m de profundidad e incubado a alta luz (AL). Los círculos amarillos corresponden a tejido colectado a 0 m e incubado a baja luz (BL). Cada punto representa el promedio de tres mediciones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

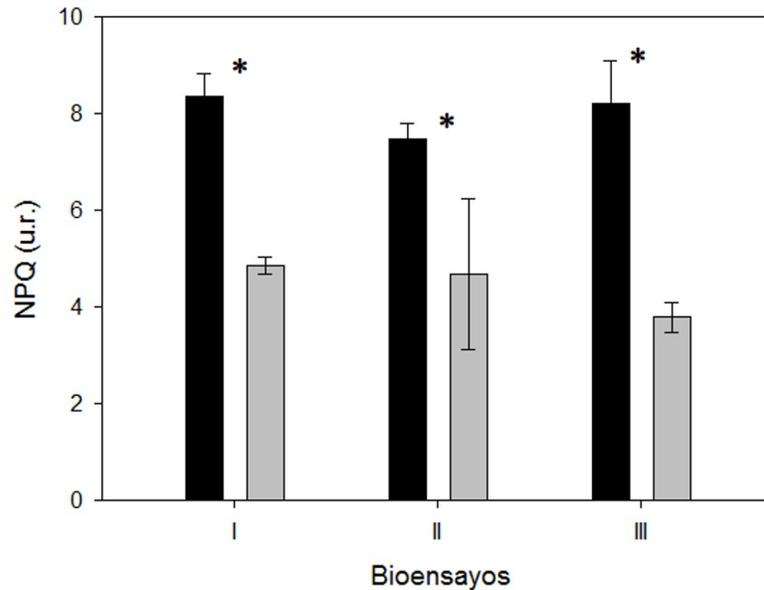
En tejido aclimatado a baja irradiancia (tratamiento BL) se registró un aumento en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en los primeros dos días del periodo de aclimatación, sin embargo sólo en el bioensayo II se detectó un aumento neto significativo del 15 % (p. 0.043) entre el día 0 y el día 6 (Fig. 21). En los tres experimentos independientes de aclimatación a BL se observó que después del segundo día de tratamiento los valores de  $F_v/F_m$  se mantuvieron estables y superiores a 0.70 (Fig. 20), lo cual indica un aumento en la capacidad máxima de flujo de electrones y por lo tanto una mayor eficiencia en la utilización de la luz.



**Figura 21.** Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) medida en el primer y último día (barras negras y grises respectivamente) de los bioensayos del tratamiento de aclimatación a BL. Cada barra representa 3 mediciones independientes  $\pm$  su desviación estándar. Una diferencia en la eficiencia cuántica del FSII entre los días de aclimatación a nivel de significancia de 0.05 se denota por \* (prueba t-Student).

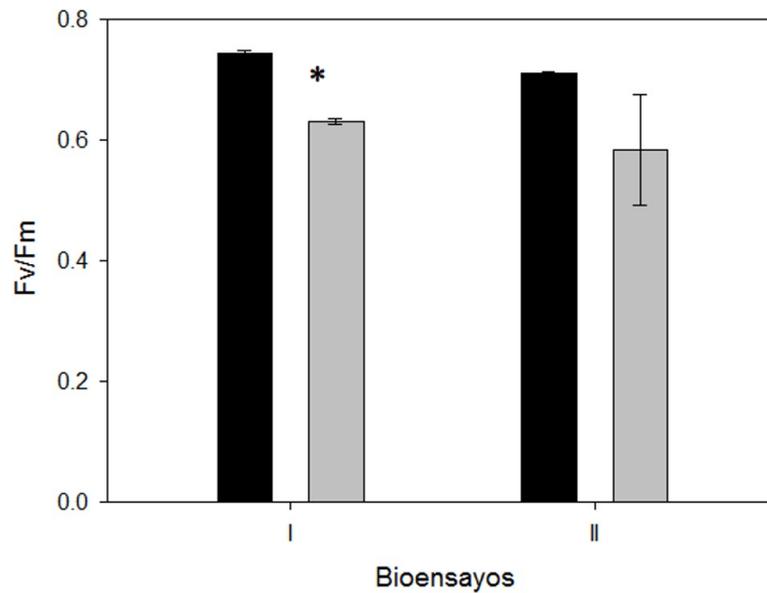
Mediante la medición del "quenching" no fotoquímico de la fluorescencia del fotosistema II (NPQ) se evaluó la capacidad de disipación térmica durante el periodo de aclimatación a BL y AL. En el tejido de superficie expuesto a BL se observó una disminución gradual en la capacidad de NPQ, lo cual fue una tendencia similar para bioensayos II y III, mientras que en el bioensayo I se observó una disminución significativa (73 %; p. 0.001) en los tres primeros días de tratamiento y posteriormente la capacidad de NPQ se incrementó en un 20 % hasta alcanzar valores estables hasta el último día del experimento (Fig. 20). Se registró una disminución promedio del 45 % en la capacidad de NPQ entre el tiempo cero y tiempo final de los 3

bioensayos de aclimatación a BL (Fig. 22). El bioensayo de mayor duración fue el III, el cual presentó el mayor porcentaje (54 %) de disminución en la capacidad de NPQ. El tejido estuvo expuesto a una menor irradiancia durante el tratamiento a BL ( $100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a diferencia de los tratamientos I y II ( $160 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



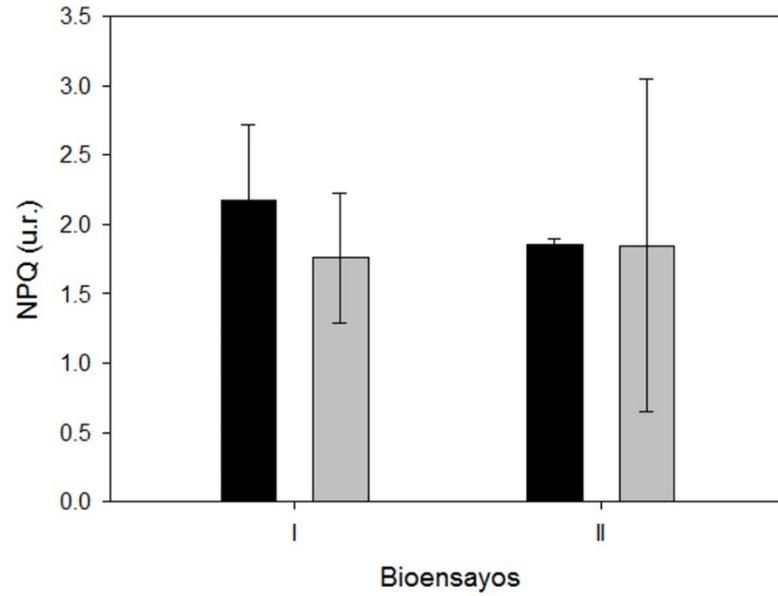
**Figura 22.** Disipación no fotoquímica (NPQ) medida en el primer y último día (barras negras y grises, respectivamente) de los bioensayos del tratamiento de aclimatación a BL. Cada barra representa 3 mediciones independientes  $\pm$  su desviación estándar. Una diferencia en los valores de NPQ entre los días de aclimatación a nivel de significancia de 0.05 se denota por \* (prueba t-Student).

Durante el periodo de aclimatación de tejido de 10 m de profundidad expuesto a alta luz (AL) se observó una disminución en la eficiencia cuántica del FSII, sin embargo sólo en el bioensayo I se detectaron diferencias significativas ( $p = 0.0001$ ) entre el tiempo 0 y el tiempo final de aclimatación (Fig. 23), con una disminución del 16 %.



**Figura 23.** Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) medida en el primer y último día (barras negras y grises respectivamente) de los bioensayos del tratamiento de aclimatación a AL. Cada barra representa 3 mediciones independientes  $\pm$  su desviación estándar. Una diferencia en la eficiencia cuántica del FSII entre los días de aclimatación a nivel de significancia de 0.05 se denota por \* (prueba t-Student).

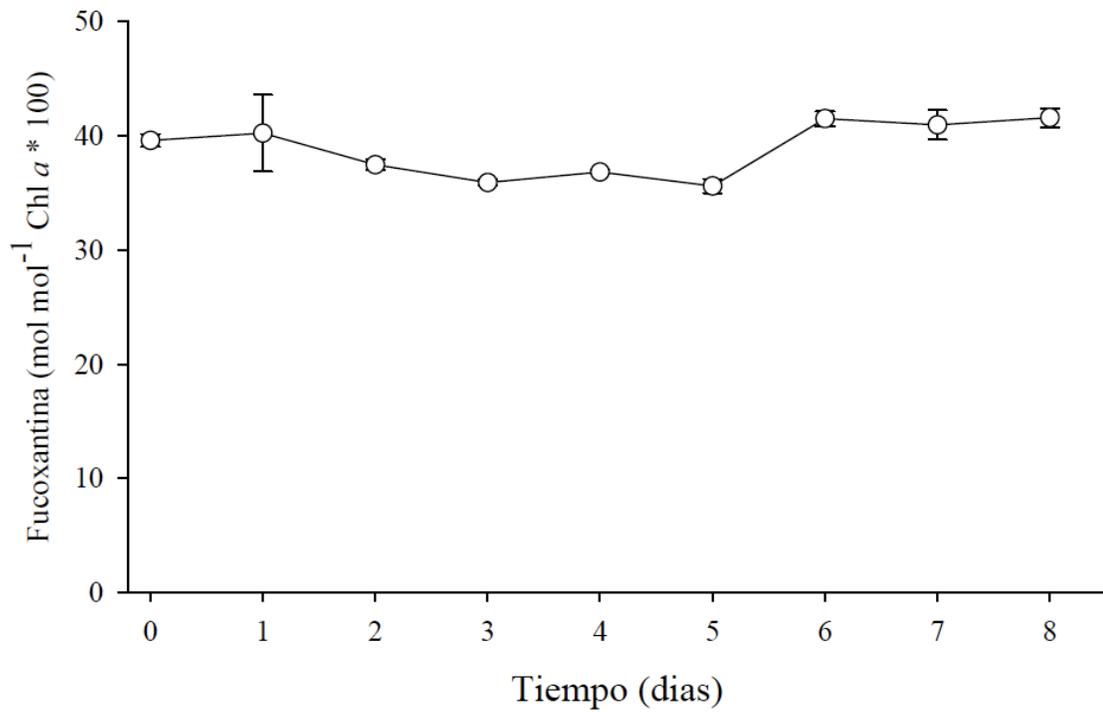
No se detectaron diferencias significativas en la capacidad de disipación térmica durante el periodo de aclimatación a AL en los bioensayos I y II (Fig. 24). Los valores de NPQ se mantuvieron estables (2 u.r) durante el tratamiento. La irradiancia a la que fue expuesto el tejido en los bioensayos I y II fue de  $600 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la cual se incrementó a  $1000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en el bioensayo III con el objetivo de que el tejido estuviera expuesto a una mayor presión por estrés lumínico. El valor inicial de Fv/Fm en el bioensayo III fue de  $0.71 \pm 0.023$ , el cual disminuyó en un 80 % después del primer día de tratamiento. Después del segundo día de aclimatación no se registró inducción de disipación térmica, el tejido comenzó a perder pigmentación y los valores de eficiencia fotosintética fueron menores a 0.1.



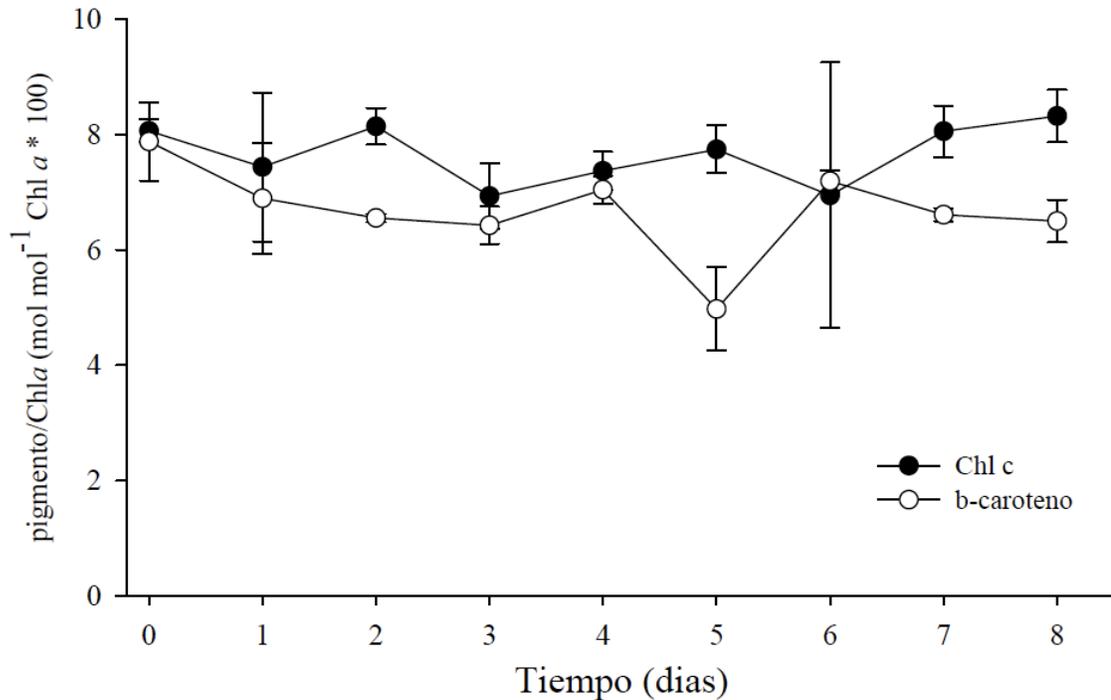
**Figura 24.** Disipación no fotoquímica (NPQ) medida en el primer y último día (barras negras y grises respectivamente) del tratamiento de aclimatación a BL. Cada barra representa 3 mediciones independientes  $\pm$  su desviación estándar.

### 6.3.2 Concentración de pigmentos

Se midió la concentración de pigmentos previo y posterior a la inducción diaria de NPQ durante el periodo del Bioensayo III (8 días). La concentración de los pigmentos fucoxantina, Chl *c* y  $\beta$ -caroteno, no presentó cambios significativos en muestras tomadas antes y después de la inducción de NPQ (datos no mostrados). Asimismo, no se detectaron cambios significativos en la concentración de fucoxantina (Fig. 25), Chl *c* y  $\beta$ -caroteno (Fig. 26) entre el día 0 y el día 8 del periodo de aclimatación.

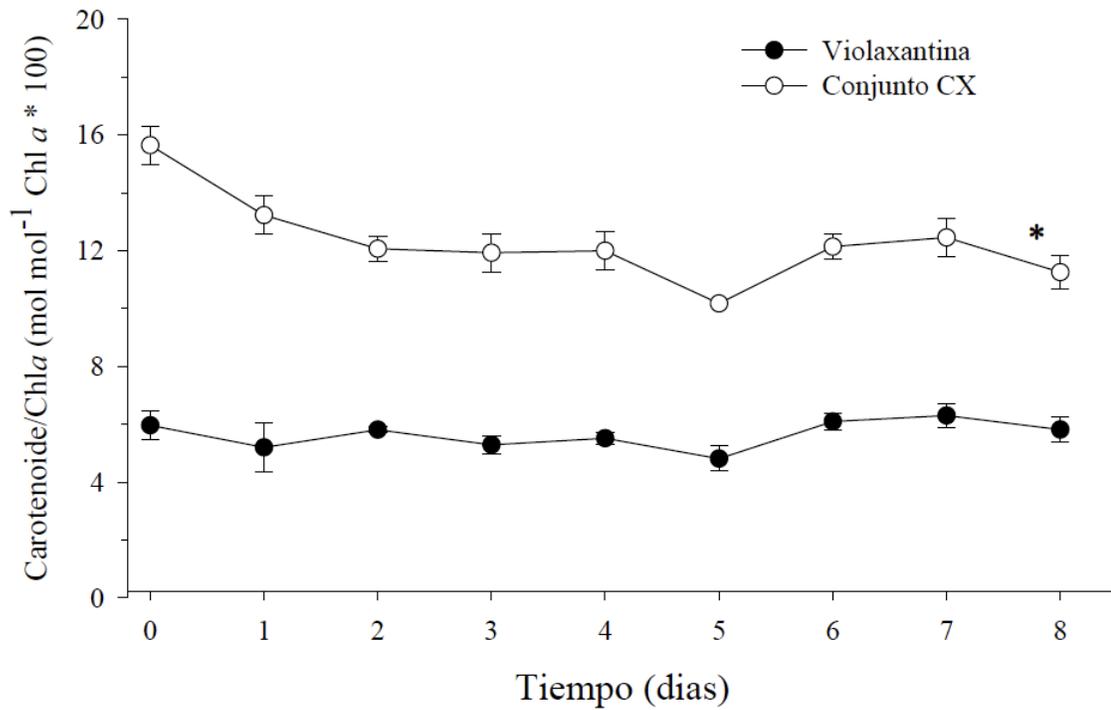


**Figura 25.** Concentración de fucoxantina en tejido de *Macrocyctis pyrifera* durante el periodo de aclimatación a baja luz. Se presenta la concentración de pigmentos en muestras colectadas después de la inducción de NPQ. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

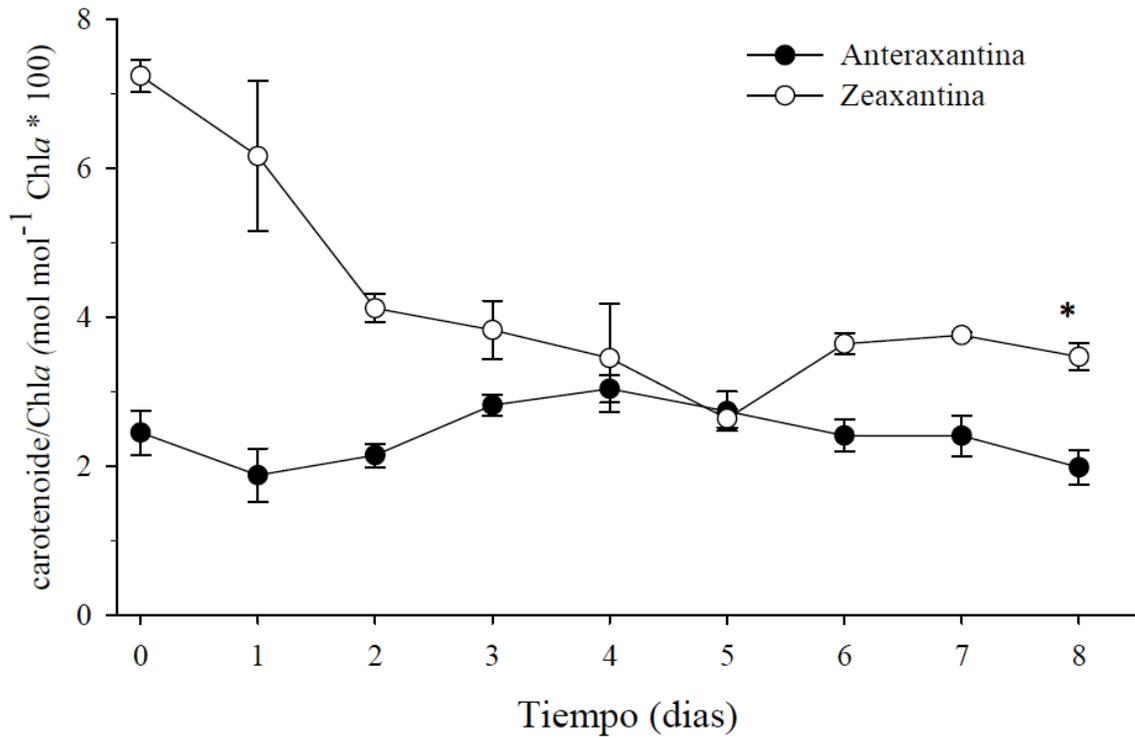


**Figura 26.** Concentración de la Chl *c* y  $\beta$ -caroteno en tejido de *Macrocystis pyrifera* durante el periodo de aclimatación a baja luz. La concentración de pigmentos se midió después de la inducción de NPQ. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

El conjunto (pool) de los pigmentos del ciclo de las xantofilas ( $\Sigma$ XC) disminuyó un 28 % ( $p < 0.05$ , prueba *t*-Student) después de 8 días de aclimatación a baja luz con respecto a la concentración al inicio del tratamiento (Fig. 27). La violaxantina representa el 100 % del  $\Sigma$ XC en muestras no expuesta a luz saturante (determinación del NPQ). Después de exponer al tejido aclimatado a BL a alta luz se llevó a cabo la conversión de violaxantina a zeaxantina. La figura 27 muestra que la cantidad de violaxantina que no es de-epoxidada permanece constante durante el periodo de aclimatación. Sin embargo, la capacidad de síntesis de zeaxantina disminuyó hasta en un 58 % ( $p < 0.05$ , prueba *t*-Student) al final del periodo de aclimatación. En los primeros 3 días de aclimatación a baja luz se observó una disminución del 45 % en la concentración de zeaxantina sintetizada en alta luz (Fig. 28), lo cual representa el 80 % de la reducción total en el periodo de aclimatación. Similar a la violaxantina, la concentración de anteraxantina después de exponer a luz saturante no presentó cambios significativos durante los 8 días del tratamiento de aclimatación a baja luz.

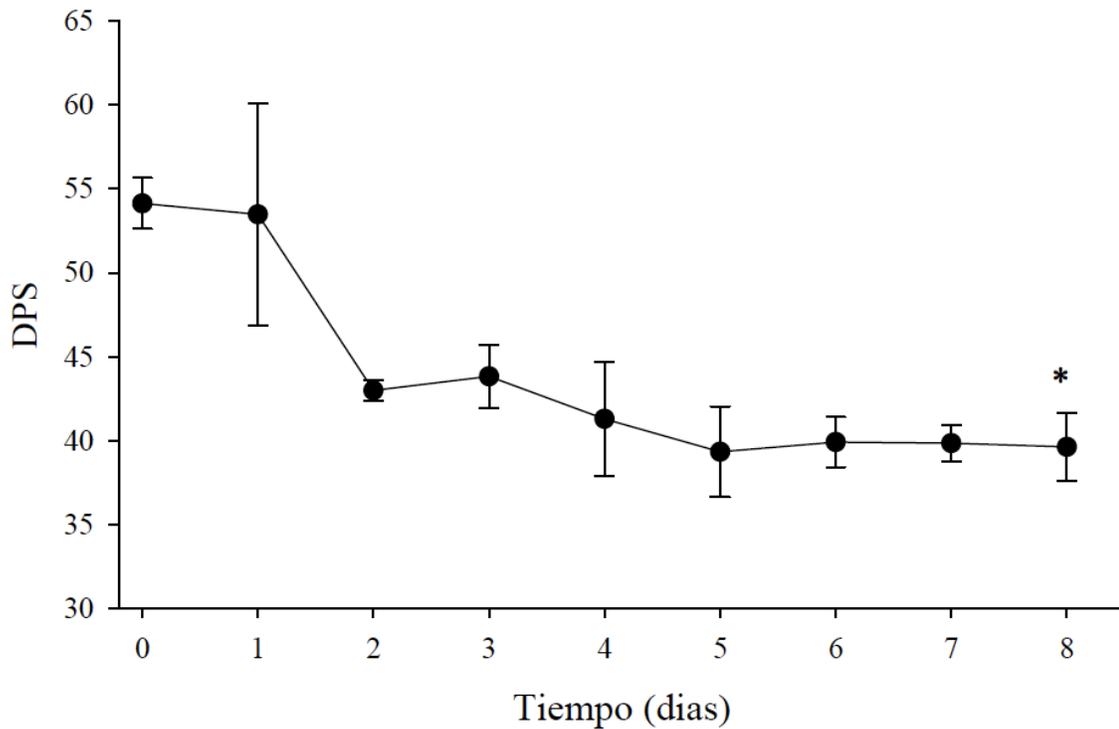


**Figura 27.** Concentración del conjunto de los pigmentos del ciclo de las xantofilas ( $\Sigma$ CX) y de la violaxantina en tejido de *Macrocystis pyrifera* durante el periodo de aclimatación a baja luz. La concentración de pigmentos se midió después de la inducción diaria de NPQ. Cada punto representa el promedio de tres replicas  $\pm$  su desviación estándar. Una diferencia en los valores de concentración entre los días 0 y 8 de aclimatación a nivel de significancia de 0.05 se denota por \* (prueba t-Student).



**Figura 28.** Concentración de anteraxantina y zeaxantina en tejido de *Macrocyctis pyrifera* durante el periodo de aclimatación a baja luz. La concentración de pigmentos se midió después de la inducción diaria de NPQ. Cada punto representa el promedio de tres replicas  $\pm$  su desviación estándar. Una diferencia en los valores de concentración entre los días 0 y 8 de aclimatación a nivel de significancia de 0.05 se denota por \* (prueba t-Student).

Se presentaron cambios significativos en el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (DPS) durante el periodo de aclimatación. Se observó una reducción del 28 % ( $p < 0.05$ , prueba *t*-Student) al final del periodo de aclimatación con respecto al día 0 (Fig. 29). La reducción más abrupta se detectó en los primeros 3 días de aclimatación en donde se observó el 80 % de la reducción total. Después del día 5 de tratamiento no se observaron cambios significativos en la suma de los pigmentos del CX o el DPS. La reducción en la capacidad de síntesis de zeaxantina determinó la variabilidad de estos parámetros, al no detectarse cambios en la violaxantina o anteraxantina en el periodo de aclimatación.



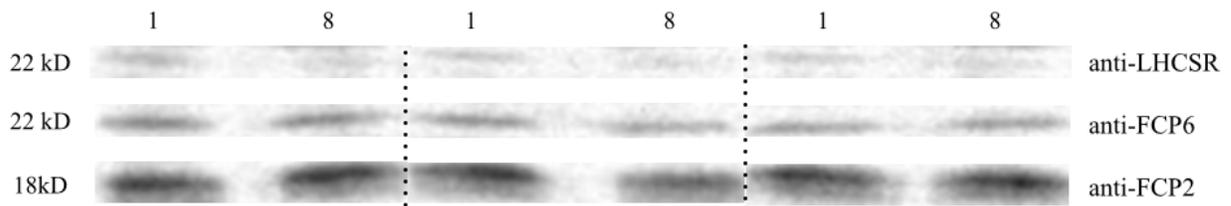
**Figura 29.** Variación del estado de de-epoxidación (DPS) en tejido de *Macrocyctis pyrifera* durante el periodo de aclimatación a baja luz. El DPS está expresado como  $([Ax*0.5]+[Zx]/\Sigma CX)\times 100$ . La concentración de pigmentos se midió después de la inducción diaria de NPQ. Cada punto representa el promedio de tres replicas  $\pm$  su desviación estándar. Una diferencia en los valores de concentración entre los días 0 y 8 de aclimatación a nivel de significancia de 0.05 se denota por \* (prueba t-Student).

En general, los pigmentos constitutivos fucoxantina, Chl *c* y  $\beta$ -caroteno no presentaron cambios significativos durante la aclimatación a baja luz, mientras que la concentración de zeaxantina, la suma de pigmentos del CX y el DPS disminuyeron significativamente en el día 8 con respecto al día 0, observándose una disminución abrupta en los primeros tres días de aclimatación.

### 6.3.3 Expresión diferencial de proteínas durante aclimatación a baja luz

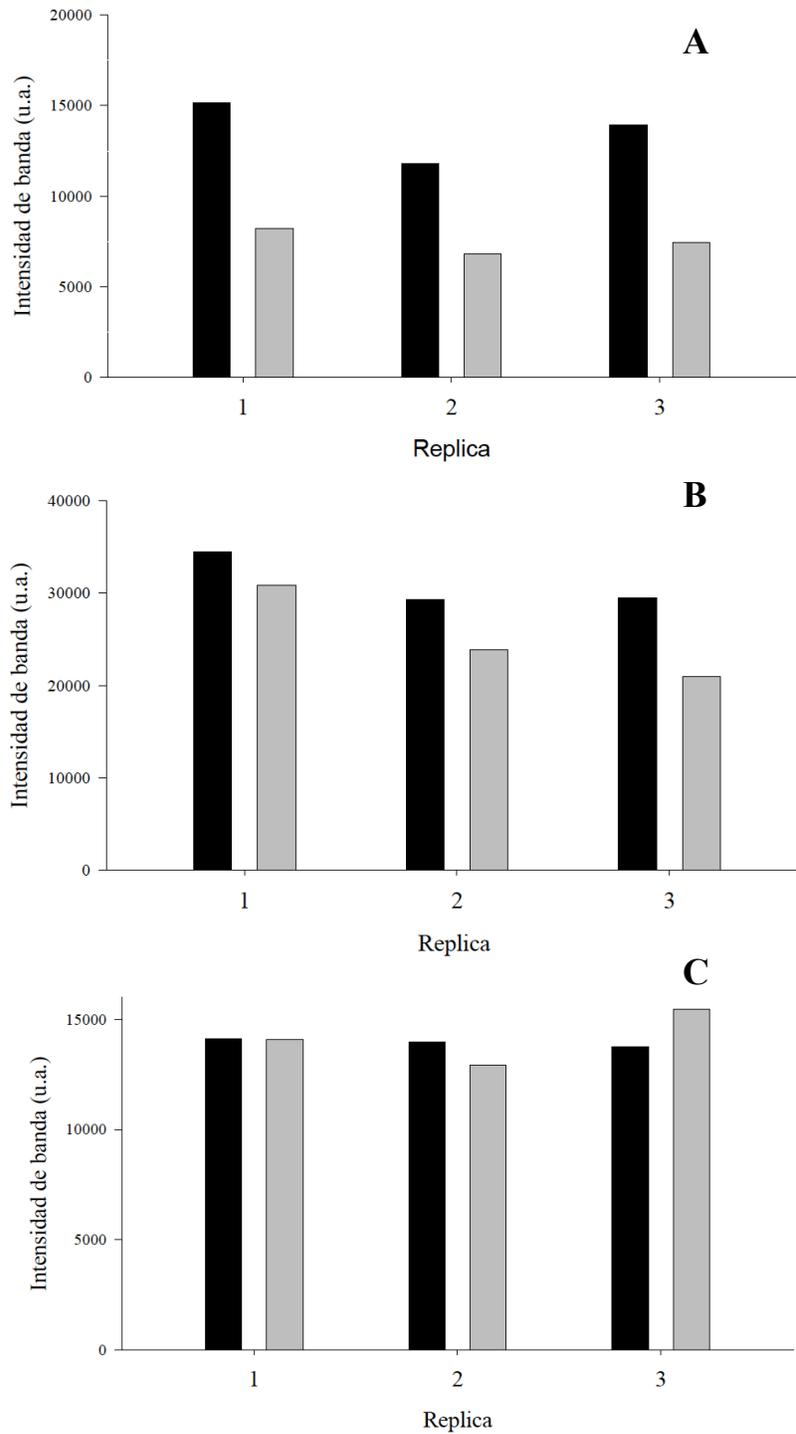
Durante el Bioensayo III se tomaron muestras diarias de tejido de *Macrocyctis pyrifera* para el análisis de expresión de proteínas. Se llevó a cabo la detección inmunológica (Western blot) de proteínas específicas mediante los anticuerpos anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2, con el objetivo de evaluar la expresión diferencial de proteínas de las antenas durante la aclimatación de tejido de alta a baja luz.

La detección de anticuerpos se realizó por medio de fluorescencia (Western Qdot), la cual resultó en más de una banda detectada en el rango de los 10 a los 30 kDa. Debido a esta inespecificidad, se llevó a cabo el análisis de cuantificación únicamente de las bandas detectadas que corresponden al peso molecular esperado de la proteína-antígeno (ver sección 6.2.2). En la figura 30 se presentan las bandas detectadas con los diferentes anticuerpos, se presenta la expresión de proteínas durante el primer y último día de aclimatación de tejido de *Macrocystis* colectado en superficie y transferido a baja luz.



**Figura 30. Inmunodetección con los anticuerpos anti-LHCSR, anti-FCP6 y anti-FCP2 de proteínas de *Macrocystis pyrifera*. Los carriles representan extractos de proteínas correspondientes al primer (1) y último (8) día de aclimatación a baja luz durante el Bioensayo III. La detección de anticuerpos se llevó a cabo por medio de la emisión de fluorescencia de puntos cuánticos (Western Qdot). Se presentan tres extracciones independientes. Las muestras fueron cargadas en base a la concentración de proteínas (100  $\mu\text{g}$  por carril). Se presentan el resultado de tres muestras independientes.**

La proteína de 22 kDa detectada por medio del anti-LHCSR presentó una disminución de expresión de entre el 43 y 47 % al final del tratamiento de aclimatación con respecto al día 1. El anticuerpo anti-Fcp6 reconoció una proteína de 22 kDa que presentó una abundancia similar en comparación con la detectada por el anti-LHCSR. Sólo se cuantificó una disminución del 10 % al 29 % en el día 8 con respecto al primer día de tratamiento. La proteína de 18 kDa reconocida por el anti-Fcp2 presentó niveles de expresión estables, ya que sólo se detectó una disminución menor al 5 % en dos de las réplicas, mientras que en la tercera replica se observó un aumento del 12 % en el día 8 con respecto a la expresión observada al comenzar la aclimatación (Fig. 31).



**Figura 31. Cuantificación de la intensidad de banda correspondiente a las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-LHCSR (A), anti-Fcp6 (B) y anti-Fcp2 (C) de muestras de *Macrocystis pyrifera* en el día 1 (barras negras) y 8 (barras grises) de aclimatación a baja luz. Las muestras fueron tomadas del Bioensayo III. La cuantificación se expresa en unidades arbitrarias (u.a.).**

## 7. Discusión

---

### 7.1 Expresión de proteínas, ciclo de las xantofilas y NPQ en tejido colectado a diferentes profundidades de la columna de agua

En el presente estudio se evaluó la concentración de proteínas que conforman las antenas del aparato fotosintético, la concentración de pigmentos y los niveles de NPQ en tejido de *M. pyrifera* aclimatado a diferentes condiciones lumínicas para identificar a las proteínas que intervienen en el proceso de la disipación térmica (DT). Un punto esencial para este objetivo fue el de tener una buena caracterización de las diferentes proteínas que conforman los complejos antena del fotosistema II.

La extracción de proteínas de tejido vegetal para estudios de proteómica es difícil debido al alto contenido de compuestos recalcitrantes presentes en plantas y algas. Los compuestos que interfieren con la extracción y precipitación de proteínas pueden ser sales, polisacáridos, pigmentos, polifenoles y otros metabolitos secundarios que deterioran cuantitativa y cualitativamente los extractos proteicos (Granier, 1988; Tsugita y Kamo, 1999; Wang *et al.*, 2008). Debido a una concentración alta de polisacáridos sulfatados, la extracción de proteínas y su posterior análisis es particularmente complicada en algas caféas (Nagai *et al.*, 2008). Por lo tanto, fue necesario implementar un protocolo de extracción que permitiera la obtención de extractos proteicos de alta calidad de tejido de *M. pyrifera*.

El protocolo que presentó los mejores resultados fue el propuesto por Wang *et al.*, (2003) con modificaciones. Este protocolo consiste en realizar una limpieza exhaustiva del tejido para obtener un polvo libre de compuestos recalcitrantes y finalmente se realiza la extracción fenólica de las proteínas. El protocolo de Wang *et al.*, (2003) originalmente se probó en hojas de *Olea europea*, las cuales presentan una alta concentración de compuestos polifenólicos. Para *M. pyrifera* fue necesario incrementar los pasos de pulverización en N<sub>2</sub> para obtener un polvo más fino y limpio con la menor degradación de proteínas posible. Asimismo, se incluyeron dos pasos de fraccionamiento salino dirigidos a precipitar proteínas de peso molecular menor a 100 kDa. Los extractos resultantes fueron adecuados para la caracterización de las proteínas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizando las proteínas con SDS (SDS-PAGE) y

detección por medio de inmunodetección (Western blot).

Una vez que se obtuvo un protocolo adecuado, se analizaron los perfiles proteínicos en tejido de *M. pyrifera* colectado a 0, 3, 6 y 10 m de profundidad en la columna de agua. Se observó el mismo patrón de bandas en los perfiles proteicos de *M. pyrifera* de tejido colectado a diferentes profundidades pero con diferencias en la densidad en algunas, lo que indica una concentración diferencial de proteínas. Específicamente, se observan cambios en la concentración de proteínas entre los 17 y 30 kDa en muestras de 0, 3, 6 y 10 m de profundidad. Estos cambios se pueden asociar a la expresión diferencial de las proteínas que conforman los complejos proteico-pigmentarios. La regulación del tamaño de la antena es una de las respuestas de aclimatación más importante al ambiente lumínico en el cual crecen los organismos fotótrofos (Hoffman y Senger, 1988; Humbeck *et al.*, 1988; Falkowski y La Roche, 1991;). Esto permite tanto la regulación de la absorción de luz como la modulación de la capacidad de fotoprotección de la maquinaria fotosintética (Falkowski y La Roche, 1991; Cruz *et al.*, 2005; de Bianchi *et al.*, 2010; Ruban *et al.*, 2012).

Debido a que la intensidad de luz se reduce exponencialmente con la profundidad, el tejido de *M. pyrifera* localizado a 3 m de profundidad puede recibir menos del 50 % de la irradiancia recibida por el tejido de la superficie, mientras que el tejido a 10 m recibe menos del 25 % del recibido a 0 m (Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013). Por lo tanto, *M. pyrifera* presenta una plasticidad importante y las frondas de un solo organismo presentan tasas fotosintéticas, composición pigmentaria y propiedades de disipación térmica diferentes en frondas colectadas a diferentes profundidades (Colombo-Pallotta *et al.*, 2006). Específicamente, las frondas de superficie tienen una alta capacidad de NPQ asociada a una concentración alta de pigmentos del ciclo de las xantofilas en comparación con frondas de mayor profundidad (Colombo-Pallotta *et al.*, 2006). Asimismo, se ha propuesto que la capacidad de NPQ en *M. pyrifera* está asociada a una co-regulación de la concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas y proteínas que intervienen en este proceso (Álvarez-Ocampo *et al.*, 2013). El aumento en la concentración de proteínas con un peso molecular de 21 y 22 kDa en tejido expuesto a una mayor irradiancia (dosel y 3 m) observado en el presente trabajo puede estar asociado a una mayor capacidad de disipación térmica en frondas de estas profundidades. Lo más probable es que estas proteínas pertenezcan a la familia LHCSR ("Light harvesting stress response proteins"). Konotchick *et al.*

(2013) reportan una sobreexpresión de genes de dos proteínas de esta familia en tejido de superficie con respecto al de 18 m de profundidad.

Se han identificado genes de la familia LHCSR en un gran número de taxones, incluyendo algas verdes y cafés (Koziol *et al.*, 2007), pero no en plantas vasculares. La familia LHCSR fue originalmente identificada como un transcrito cuya regulación es dependiente de la luz, e denominada anteriormente como LI818 (Gagné y Guertin, 1992). La expresión de las proteínas de la familia LHCSR no es regulada como la mayoría de las proteínas de la familia LHC, las cuales están involucradas principalmente en los procesos de absorción de luz (Peers *et al.*, 2009). Se ha documentado que los transcritos *LhcSR* se acumulan bajo condiciones ambientales que inducen estrés fotooxidativo, tales como privación de dióxido de carbono, azufre o hierro, así como condiciones de alta luz (Ledford *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Naumann *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los genes de la familia LHCSR se expresan en respuesta a condiciones de estrés y que probablemente tengan una función fotoprotectora bajo condiciones de estrés lumínico. En el alga verde *C. reinhardtii* se han identificado 3 genes anotados como *LhcSR1*, *LhcSR2* y *LhcSR3* (Shrager *et al.*, 2003) donde la proteína LhcSR3 es requerida para que se lleve a cabo la DT (Peers *et al.*, 2009, Liguori *et al.*, 2013), específicamente está involucrada en el componente rápido (qE) del NPQ (Li *et al.*, 2002).

En diatomeas, se observó asimismo que los genes que codifican a las proteínas *fcp6*, *fcp7* y *fcp12* de la diatomea *Cyclotella criptica* son sobre expresados durante un estrés lumínico, y se ha sugerido que estas proteínas están involucradas en los mecanismos de disipación térmica del exceso de energía en diatomeas (Lavaud, 2007; Janssen *et al.*, 2001; Depauw *et al.*, 2012; Lepetit *et al.*, 2013). Análisis filogenéticos demuestran que existe homología entre los genes que codifican a estas proteínas con los de las familia LHCSR (LI818) del alga verde *C. reinhardtii* (Eppard y Rhiel, 1998) y recientemente se reconoce que estas proteínas pertenecen a la familia LHCSR renombrándose como Lhcx en diatomeas (Bailleul *et al.*, 2010; Zhu y Green, 2010). Específicamente a la proteína *fcp6* se le reconoce como Lhcx1 y tanto la expresión de esta proteína como la de Lhcx6, han sido relacionadas con la regulación de los procesos de la DT en diatomeas (Becker y Rhiel, 2006; Bailleul *et al.*, 2010; Zhu y Green *et al.*, 2010; Lepetit *et al.*, 2013)

Se probó el reconocimiento de proteínas de *M. pyrifera* por los anticuerpos de anti-Fcp2, anti-Fcp6 y anti-LHCSR. Los anticuerpos anti-Fcp2 y anti-Fcp6 fueron obtenidos a partir de un antisuero dirigido contra la región carboxilo terminal de las proteínas Fcp2 (18 kDa) y Fcp6 (22 kDa) de la diatomea *Cyclotella criptica* (Westermann y Rhiel, 2005). La proteína Fcp2 forma parte de las proteínas de la familia Lhcf, las cuales forman parte de las antenas mayores de diatomeas (Beer *et al.*, 2006; Lavaud, 2007; Lepetit *et al.*, 2007) y son sobre expresadas en condiciones de baja luz (Westermann y Rhiel, 2005; Becker y Rhiel, 2006; Beer *et al.*, 2006). Mediante el anticuerpo anti-Fcp6 se demostró que en la diatomea *Thalassiosira pseudonana*, la proteína Lhcx1 se sobreexpresa bajo condiciones de estrés lumínico (Zhu y Green, 2010). El anti-LHCSR es un anticuerpo policlonal dirigido contra el polipéptido LI818 (22 kDa; LhcSR3) del alga verde *C. reinhardtii* (Richard *et al.*, 2000). Este anticuerpo ha sido utilizado contra proteínas Lhcx de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Bailleul *et al.*, 2010; Lepetit *et al.*, 2013) y debido al incremento de la expresión de la proteína reconocida por este anticuerpo bajo condiciones de estrés lumínico, se ha propuesto que tiene alguna función en los procesos de fotoprotección (Bailleul *et al.*, 2010).

La detección de la unión de las proteínas con los anticuerpos se llevó a cabo por medio de la reacción colorimétrica del sustrato TMB y utilizando el kit comercial Western Qdot (fluorescencia). La detección por medio de fluorescencia resultó inespecífica, ya que varias bandas presentaron emisión, a diferencia de la detección por medio de TMB, en la que sólo se observó una banda en la membrana. Los resultados de detección de varias proteínas parece estar asociado a problemas de reacción con el anticuerpo secundario o la reacción con el fluoróforo y no necesariamente a que el anticuerpo primario sea inespecífico. Al igual que con la separación y extracción de las proteínas, se necesita una correcta implementación de este protocolo de detección con anticuerpos y por medio de fluorescencia para *M. pyrifera*. Debido a que quedó fuera del marco de este trabajo el realizar pruebas para la implementación correcta de la detección por medio de fluorescencia, se presentó el cambio de señal de las proteínas detectadas con un peso molecular correspondiente a las proteínas antígeno de cada anticuerpo. Este análisis se basó asimismo en los resultados con TMB, ya que con este protocolo se observó la detección de proteínas del tamaño esperado para los anticuerpos usados.

Los anticuerpos anti-Fcp2, anti-Fcp6 y anti-LHCSR han sido utilizado en estudios previos de diatomeas (Becker y Rhiel, 2006; Zhu y Green, 2010; Bailleul *et al.*, 2010; Lepetit *et al.*, 2013), por lo que se espera que reaccionen con proteínas de *M. pyrifera* dada la relación filogenética entre las algas pardas y diatomeas, ambas pertenecientes al phylum Heterokontofita. La concentración de la proteínas detectadas con el anti-LHCSR fue menor (24-41% TMB; 66-85% Qdot) en frondas de 10 m de profundidad en comparación a la concentración detectada en tejido del dosel. La diatomea *Phaeodactylum tricornutum* aclimatada a alta luz, presentó una sobreexpresión de la proteína Lhcx1 reconocida por el anticuerpo anti-LHCSR con respecto a las células aclimatadas a baja luz (Bailleul *et al.* 2010). La proteína Lhcx1 está presente en oscuridad o en condiciones de baja luz, pero cuando las células se expusieron a una alta irradiancia se detectó una sobreexpresión de esta proteína, acompañada de un incremento en NPQ y del estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas. La presencia constitutiva de esta proteína en diatomeas aclimatadas a condiciones no estresantes podría proporcionar a la maquinaria fotosintética la capacidad de anticipar cambios repentinos de irradiancia en el ambiente (Bailleul *et al.*, 2010). En otros estudios realizados, también en *P. tricornutum*, se ha detectado la sobreexpresión de isoformas de la proteína Lhcx (Lhcx1, Lhcx2 y Lhcx3) bajo condiciones de estrés lumínico, asociado a un aumento en la amplitud de qE (Lepetit *et al.*, 2013). Como ya se mencionó, en tejido de *M. pyrifera* aclimatado a alta luz se detectó un aumento en la expresión de una proteína de 22 kDa que puede corresponder a la isoforma Lhcx1 o una proteína similar a la detectada en diatomeas, tomando en cuenta el peso molecular y la reacción detectada con los anticuerpos anti-FCP6 y anti-LHCSR.

Existió sobreexpresión de la proteína detectada por el anti-Fcp6 y anti-LHCSR en frondas de *M. pyrifera* colectadas en superficie con respecto a las de mayor profundidad, con una concentración de 3 a 5 veces mayor en frondas del dosel. En la diatomea *P. tricornutum* cultivada bajo condiciones de alta luz se ha detectado un aumento de 4 a 5 veces la expresión de Fcp6 con respecto a cultivos expuestos a bajas irradiancias (Becker y Rhiel, 2006; Zhu y Green, 2010). Se ha propuesto que esta proteína proporciona estabilidad a la membrana tilacoide y que no está directamente involucrada en una respuesta al estrés por luz, ya que además de acumularse en periodos de alta luz, la proteína está presente en el periodo de recuperación (oscuridad) posterior a la exposición del cultivo a alta irradiancia (Zhu y Green, 2010).

La proteína reconocida por el anti-Fcp2, con un peso molecular de 18 kDa, presentó la concentración más alta de las tres proteínas analizadas en este trabajo, representada por la alta densidad de las bandas detectadas ya sea por TMB o por fluorescencia. La proteína Fcp2 pertenece a las FCPs (“Fucoxanthin binding proteins”) que forman la mayor parte de los complejos antena en diatomeas (Beer *et al.*, 2006; Lepetit *et al.*, 2007) y es sobreexpresada en condiciones de baja luz (Becker y Rhiel, 2006). Esta proteína no está relacionada filogenéticamente con las LI818 (LHCSR) de las algas verdes y no ha sido relacionada a los procesos de fotoprotección, por lo que se sugiere que forme parte de las antenas cercanas a los centros de reacción, las cuales hacen eficiente la absorción de energía (Lavaud, 2007). Los resultados de este trabajo no concuerdan con lo anterior, ya que la proteína Fcp2 no presentó cambios de expresión (detección con TMB) o se sobreexpresó (detección por fluorescencia) en tejido de superficie con respecto al tejido colectado a 10 m de profundidad. Mediante la detección por medio del sustrato TMB, el anti-Fcp2 también reconoció a una proteína de 17 kDa, la cual fue expresada sólo en tejido de 10 m y no en tejido de 0, 3, ó 6 m de profundidad. La proteína Fcp2 (18 kDa) forma parte de las antenas mayores que rodean los centros de reacción, por lo que está presente de forma constitutiva en la maquinaria fotosintética (Becker y Rhiel, 2006, Lavaud, 2007), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, la expresión de la proteína detectada por el anti-Fcp2 con un peso molecular de 17 kDa no sigue el patrón característico de expresión para este tipo de proteínas de la antena. Probablemente dicho anticuerpo reconoció una proteína perteneciente a un grupo distinto al de la familia de las FCPs de las antenas mayores, por ejemplo al grupo de proteínas homólogas a las que constituyen las antenas en algas rojas y que son expresadas exclusivamente bajo condiciones de oscuridad o baja luz en diatomeas (Eppard y Rhiel, 1998; Armbrust *et al.*, 2004; Lavaud, 2007).

Se midió la concentración de pigmentos en tejido colectado a diferentes profundidades (0, 3, 6 y 10 m) de la columna de agua. Una de las principales diferencias en la pigmentación entre tejido de diferentes profundidades fue el aumento de fucoxantina y Chl *c* (normalizadas a la concentración de Chl *a*) en frondas basales con respecto a las de superficie. Este aumento es atribuido a la respuesta del organismo para incrementar la absorción de las longitudes de onda predominantes a 10 m (Smith y Melis, 1987). El aumento en la concentración de  $\beta$ -caroteno en tejido expuesto a alta luz es una respuesta fotoprotectiva. La concentración de este pigmento aumentó un 50% en frondas colectadas en superficie con respecto al de 6 y 10 m de profundidad.

La mayor variación entre los pigmentos cuantificados fue el de la suma del conjunto de los pigmentos del ciclo de las xantofilas ya que se observó una disminución de un 75 % en tejido de 10 m con respecto a tejido de superficie y por lo tanto se detectó una disminución del estado de de-epoxidación de los pigmentos fotoprotectores con profundidad. Por lo tanto, las frondas de superficie presentaron un NPQ tres veces más alto que las frondas de 10 m. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros estudios que han caracterizado la fisiología fotosintética de *M. pyrifera* (Colombo-Pallotta *et al.*, 2006; García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007) en donde se encontró que la suma de los pigmentos del ciclo de las xantofilas está correlacionada con la capacidad de NPQ en tejido de diferentes profundidades (Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013).

En resumen, se detectó una concentración diferencial de las proteínas que reaccionaron con los anticuerpos anti-Fcp2, anti-Fcp6 y anti-LHCSR en tejido de *M. pyrifera* aclimatado a diferentes ambientes lumínicos, presentándose una mayor concentración de la proteína de 22 kDa en frondas superficiales. Asimismo, se detectó un aumento en la concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas y una alta capacidad de NPQ en comparación con frondas situadas a 10 m de profundidad. Esto sugiere que estas proteínas podrían estar relacionadas en el control de esta respuesta fotoprotectiva en *M. pyrifera*.

## **7.2 Cambios en la expresión de proteínas en respuesta a la aclimatación de *M. pyrifera* a diferentes condiciones ambientales**

La concentración diferencial de la proteína de 22 kDa con profundidad y reconocida por los anticuerpos anti-LHCRS y anti-FCP6 indica que esta proteína interviene en el proceso de disipación térmica en *M. pyrifera*. La medición conjunta de estos parámetros y el de la expresión diferencial de proteínas durante el proceso de aclimatación a baja luz permitió tener más evidencia del posible rol de las proteínas de los complejos antena sobre el control del NPQ.

Se realizaron bioensayos para medir la capacidad de disipación térmica de la macroalga durante un periodo determinado de aclimatación. Además de la medición de NPQ y eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm), se midió la concentración de pigmentos y el cambio de la expresión de proteínas durante el periodo de aclimatación. Existen estudios en microalgas que han desarrollado aproximaciones experimentales similares a las de este trabajo (Zhu y Green, 2010; Bonente *et al.*, 2010; Bailleul *et al.*, 2010; Allorent *et al.*, 2013; Lepetit *et al.*, 2013), en

donde utilizan principalmente al alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* o a la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* como modelo de estudio para elucidar los componentes principales que participan en la regulación del proceso de fotoaclimatación, sin embargo estos trabajos se han llevado a cabo en escalas de tiempo menores (minutos a horas). Como primera aproximación en este trabajo se realizó una aclimatación a baja y alta luz en una escala de 6 horas, sin obtener respuesta de cambio en el estado de fotoaclimatación medido a través de la capacidad de NPQ máximo (datos no mostrados). En *M. pyrifer* es necesario un periodo de aclimatación de días para alcanzar un nivel estable en la capacidad de NPQ y eficiencia cuántica máxima entre dos condiciones ambientales diferentes.

Se realizaron tres bioensayos independientes de aclimatación de tejido a alta (AL) y baja luz (BL), en los cuales se identificaron patrones similares en las respuestas fotoaclimatativas medidas. En tejido colectado a 10 m de profundidad y transferido a AL, se observó un decaimiento de  $F_v/F_m$  durante el periodo de aclimatación. La disminución de este parámetro indica una reducción de la eficiencia del FSII debido al daño acumulado en este sistema. En el bioensayo III se incrementó la irradiancia del tratamiento de aclimatación a AL de 600 a 1000  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El  $F_v/F_m$  disminuyó en un 80% el primer día de exposición y no se detectó actividad en el FSII en los días posteriores, lo que indicó que el tratamiento lumínico fue muy severo, por lo que no se pudo caracterizar la dinámica de aclimatación de baja a alta luz. Por otro lado, la recuperación de la eficiencia cuántica del FSII en tejido de superficie sugiere que éste se aclimató a las condiciones de baja luz. Estos resultados coinciden con la respuesta clásica de algas y plantas aclimatadas a diferentes intensidades de luz. En fotótrofos aclimatados a altos niveles de irradiancia, la capacidad para absorber luz es menor, ya sea por que presentan un menor tamaño de la unidad fotosintética (PSU) o menor número de PSU, mientras que organismos aclimatados a baja luz presentan eficiencias cuánticas máximas mayores, mediante el incremento del número o del tamaño de PSU (Falkowski y La Roche, 1991). Esta respuesta de fotoaclimatación permite que aumente la probabilidad de que un fotón sea absorbido por los pigmentos asociados a los fotosistemas (Lünning, 1990).

En tejido colectado a 10 m de profundidad y transferido a AL, no se detectaron cambios significativos en la capacidad de NPQ entre el primer y último día de aclimatación, ya que el NPQ durante este periodo se mantuvo constante con valores alrededor de 2. La reducción de la

eficiencia en la utilización de la luz en altas irradiancias, mediada por el aumento de la disipación no fotoquímica de energía es una manifestación de la capacidad de aclimatación fisiológica a condiciones de luz cambiantes (García-Mendoza, 2000). En la aclimatación AL se observó una disminución en  $F_v/F_m$ , pero no un incremento en la capacidad de NPQ, por lo que el tejido de 10 m parece que perdió la capacidad para modular los componentes responsables del NPQ, por lo menos bajo las condiciones de los bioensayos implementados. Por otro lado, el tejido colectado en superficie y transferido a un régimen de BL, manifestó una disminución significativa de la capacidad de NPQ durante el periodo de aclimatación, en donde se observó una reducción gradual del NPQ de más del 50% con respecto al medido en tiempo 0 (bioensayo III). El bioensayo en el cual se observó una mayor reducción de NPQ (bioensayo III) fue también el de mayor duración y en el que el tejido estuvo expuesto a una menor irradiancia ( $100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Durante el bioensayo III la concentración fucoxantina, Chl *c* y  $\beta$ -caroteno, no presentó cambios significativos. La disminución del NPQ en el bioensayo III estuvo acompañada de una reducción, también gradual, de la suma de los pigmentos involucrados en el ciclo de las xantofilas, específicamente del pigmento fotoprotector zeaxantina, el cual disminuyó un 58% en el día 8 con respecto al día 0 de aclimatación. La reducción de zeaxantina se vio reflejada en la disminución del estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, el cual decayó un 28% al finalizar el tratamiento de BL. El decaimiento en la capacidad de NPQ durante el periodo de aclimatación a BL es similar a la disminución del estado de de-epoxidación de las xantofilas y en ambos casos el mayor porcentaje de reducción se observa en los tres primeros días de aclimatación a BL. La reducción simultánea del NPQ y de los pigmentos fotoprotectores apoya la hipótesis de que la capacidad de fotoprotección en *M. pyrifera* está regulada principalmente por la actividad del ciclo de las xantofilas (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007; García-Mendoza *et al.*, 2011; Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013)

Una observación importante es que la concentración de violaxantina detectada en tejido expuesto a luz saturante durante los 8 días de aclimatación a baja luz se mantuvo constante. En plantas superiores, se han identificado diferentes pools de violaxantina de acuerdo a su accesibilidad a la enzima violaxantina deepoxidasa (VDE). La violaxantina debe estar separada de las proteínas de la antena para ser convertida en zeaxantina (Jahns *et al.*, 2001) y la de-

epoxidación ocurre en sitios con alto contenido del galactolípido monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) (Schaller *et al.*, 2010). La violaxantina asociada a algunas proteínas de la antena menor no es de fácil acceso para la VDE, mientras que la violaxantina asociada a la antena periférica del FSII y el pool libre es de-epoxidada rápidamente (Farber *et al.*, 1997; Jahns *et al.*, 2001). En plantas se ha reportado la existencia de un pool de violaxantina disuelto en cápsulas de MGDG que rodean la antena periférica del FSII (Schaller *et al.*, 2010). En diatomeas se ha reportado un pool de diadinoxantina libre relacionado con los MGDG y particularmente este pool es más grande en diatomeas aclimatadas a alta luz (Lepetit *et al.*, 2010). Ocampo-Álvarez *et al.*, (2013) propusieron que un pool grande de pigmentos fácilmente accesibles a la VDE podría explicar el incremento en la tasa de de-epoxidación y en consecuencia una formación más rápida del NPQ en frondas de *M. pyrifera* aclimatadas a alta luz. En el presente estudio se detectaron cambios en la concentración de los pigmentos de-epoxidados, los cuales probablemente pertenecen a este pool libre que es el que parece regularse durante el proceso de fotoaclimatación. Dicho pool de pigmentos podría estar libre o asociado a una proteína específica de la antena periférica del PSII, de la cual se esperaría una respuesta de expresión similar a la concentración del pool libre de pigmentos del CX, es decir, que cuando este pool libre disminuye también se reduce la expresión de la proteína asociada.

Probablemente el pool de violaxantina que no cambia durante el periodo de aclimatación pudiera estar asociado a la proteína reconocida por el anti-Fcp2 o a otra proteína de la familia FCP, ya que la proteína de 18 kDa detectada por el anti-Fcp2 no presentó cambios de expresión durante el periodo de aclimatación a BL. Se ha descrito que la proteína Fcp2 forma parte de la antena periférica del aparato fotosintético de diatomeas (Westermann y Rhiel, 2005; Becker y Rhiel, 2006), por lo que se esperaba que en conjunto con otras proteínas de la antena, su expresión se redujera bajo condiciones de baja luz. El pool de violaxantina asociado a este tipo de proteínas probablemente no es accesible a la violaxantina de-epoxidasa, y por lo tanto este complejo proteico-pigmentario parece no modularse durante el proceso de aclimatación, es decir, esta antena no regula el tamaño y los pigmentos asociados en relación a las condiciones del ambiente lumínico (baja o alta luz). De esta manera *M. pyrifera* puede tener una alta capacidad de fotoprotección modulando el pool libre de pigmentos del XC y al mismo tiempo una eficiente captación de luz manteniendo un complejo de antenas captadoras de luz de tamaño constante.

La cantidad y tasa de formación de zeaxantina es importante para la formación de NPQ en *M. pyrifera*, sin embargo deben existir sitios en donde se lleve a cabo la disipación térmica, los llamados sitios de “quenching”. En plantas superiores los sitios de “quenching” pueden estar localizados en la antena menor o en la antena periférica del PSII, en donde se localiza un heterodímero clorofila-zeaxantina/luteína y se lleva a cabo la disipación del exceso de energía (Holt *et al.*, 2004; Holzwarth *et al.*, 2009). La transferencia de energía directamente del estado excitado de clorofila *a* un estado excitado de luteína o zeaxantina induce el proceso de disipación térmica (Pascal *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2008). En algas pardas no existe ningún trabajo sobre proteínas o complejos específicos involucrados en la regulación de la disipación térmica del exceso de energía, sin embargo se han identificado 13 copias de genes que codifican para proteínas de la familia LHCSR en el genoma de *Ectocarpus siliculosus* (Cock *et al.*, 2010; Dittami *et al.*, 2010), la única alga parda de la cual se conoce el genoma completo. Estudios filogenéticos sugieren que las proteínas LHCSR pudieron haber sido originadas en organismos con Chl *c* y que las algas verdes las adquirieron por medio de eventos de transferencia horizontal (Dittami *et al.*, 2010). En este estudio se propone que las proteínas de la familia LHCSR son candidatas a funcionar como sitio de “quenching”. La reducción del NPQ y zeaxantina durante la aclimatación a BL estuvo acompañada de la disminución de las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-Fcp6 y anti-LHCSR. La proteína de 22 kDa reconocida por el anti-LHCSR, presentó una reducción del 43 al 47% en el último día de aclimatación con respecto a la expresión en el día 0, mientras que la proteína de 22 kDa reconocida por el anti-Fcp6 se redujo de un 10 a 29% en el último día de tratamiento. Las dos proteínas respondieron de la misma manera por lo que podría tratarse de una misma proteína reconocida por los dos anticuerpos o dos proteínas distintas con una función similar en los complejos antena. La reducción en la abundancia de esta(s) proteína(s) probablemente esté asociada a una respuesta de fotoaclimatación en la que los sitios de quenching disminuyen en respuesta a la disminución de la presión por estrés lumínico.

Integrando los resultados de transcripción (Konotchick *et al.*, 2013), de fisiología (regulación de NPQ; García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007; García-Mendoza *et al.*, 2011; Ocampo-Álvarez *et al.*, 2013; presente estudio) y de análisis de proteínas (presente estudio) se propone que la(s) proteína(s) de 22 kDa reconocida por el anti-Fcp6 y anti-LHCSR podrían ser un componente clave en el control del NPQ en *M. pyrifera*, y que los sitios de “quenching” de estados excitados de la clorofila estén localizados en esta proteína.

## Conclusiones

---

Las proteínas de la antena del aparato fotosintético de *M. pyrifera* detectadas con los anticuerpos anti-Fcp6 y anti-LHCSR se expresan diferencialmente en tejido aclimatado a diferentes irradiancias. La concentración de la proteína de peso molecular de 22 kDa es mayor en tejido de superficie (aclimatado a alta luz) con respecto al tejido colectado a mayores profundidades (aclimatado a baja luz). Este aumento está asociado a una mayor capacidad de NPQ y una mayor concentración del conjunto de los pigmentos del ciclo de las xantofilas. Asimismo, el nivel de expresión de la proteína de peso molecular de 22 kDa disminuye al mantener el tejido aclimatado a alta luz (dosel) a una condición de baja irradiancia. La reducción de esta expresión es paralela a una disminución en la capacidad de sintetizar zeaxantina y por lo tanto disminuye el DPS y el NPQ durante el proceso de aclimatación a baja luz. Por lo tanto, se sugiere que existe una co-regulación entre la expresión de esta proteína y los componentes del NPQ en *M. pyrifera*.

## Referencias bibliográficas

- Ahn TK, Avenson TJ, Ballottari M, Cheng Y-C, Niyogi KK, Bassi R, Fleming GR (2008). Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science* 320:794-797.
- Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2010). *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 28–33.
- Allen JF (1998), Light, time and microorganisms. In: Caddick MX, Baumberg S, Hodgson DA, Phillips-Jones MK (eds) Microbial responses to light and time. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 1-31.
- Allorent G, Tokutsu R, Roach T, Peers G, Cardol P, Girard-Bascou J, et al. (2013). A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 25:545–557.
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kröger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamtrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306:79-86.
- Bailleul B., Rogato A., Martino A., Coesel S., Cardol P., Bowler C., Falciatore A., Finazzi G. (2010). An atypical member of the light harvesting complex stress-related protein family modulates diatom responses to light. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 14-19.
- Becker F, Rhiel E (2006). Immuno-electron microscopic quantification of the fucoxanthin chlorophyll a/c binding polypeptides Fcp2, Fcp4 and Fcp6 of *Cyclotella cryptica* grown under low- and high-light intensities. *International Microbiology* 9:29:36.
- Beer A, Gundermann K, Beckmann J, Büchel C (2006). Subunit composition and pigmentation of fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: evidence for a subunit involved in diadinoxanthin and diatoxanthin binding. *Biochemistry* 45:13046-13053.
- Björkman O, Demmig-Adams B (1995). Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: Schulze ED, Caldwell MM (eds) Ecophysiology of Photosynthesis. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, GE. pp. 17-47.
- Bonente G, Ballottari M, Truong TB, Morosinotto T, Ahn TK, Fleming GR, Niyogi KK, Bassi R (2010). Analysis of LhcSR3, a protein for feedback de-excitation in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS Biology* 9:e1000577

- Bonente G, Passarini F, Cazzaniga S, Mancone C, Buia MC, Tripodi M, Bassi R, Caffarri S (2008). The occurrence of the psbS gene product in *Chlamydomonas reinhardtii* and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching. *Photochemistry and Photobiology* 84:1359–1370.
- Clark RP, Edwards MS, Foster MS (2004). Effects of shade from multiple kelp canopies on an understory algal assemblage. *Marine Ecology Progress Series* 267:107-119.
- Cock M, Sterck L, Rouze P, Scornet D, Allen A et al. (2010). The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465:617–621.
- Colombo-Pallotta F, García-Mendoza E, Ladah LB (2006). Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. *Journal of Phycology* 42:1225–1234.
- Colombo-Pallotta MF (2006). Fotosíntesis y fotoprotección de *Macrocystis pyrifera* en la escala espacial y temporal. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, pp 149.
- Contreras L, Ritter A, Dennet G, Boehmwald F, Guitton N, Pineau C, Moenne A, Potin P, Correa J (2008). Two-dimensional gel electrophoresis analysis of brown algal protein extracts. *Journal of Phycology* 44:1315-1321.
- Cruz JA, Avenson TJ, Kanazawa A, Takizawa K, Edwards GE (2005). Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56:395-406.
- De Bianchi S, Ballottari M, Dall'Osto L, Bassi R (2010). Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy. *Biochemistry Society Transactions* 38: 651–660.
- Dean TA (1985). The temporal and spatial distribution of underwater quantum irradiation in a Southern California kelp forest. *Estuarine Coastal Shelf Science* 21: 835-844.
- Demmig-Adams B, Adams IIIW (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43:599-626.
- Depauw AF, Rogato A, Ribera-d'Alcala M, Falciatore A (2012). Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. *Journal of Experimental Botany* 63:1575-1591.
- Dittami SM, Michel G, Collén J, Boyen C, Tonon T (2010). Chlorophyll-binding proteins revisited - a multigenic family of light-harvesting and stress proteins from a brown algal perspective. *BMC Evolutionary Biology* 10:365
- Eppard M, Rhiel E (1998). The genes encoding light-harvesting subunits of *Ciclotella cryptica* (Bacillariophyceae) constitute a complex and heterogeneous family. *Molecular Gen Genetics* 260:335-345.

- Falkowski PG, Knoll A (2007). Evolution of primary producers in the sea. Elsevier Academic Press. London, UK. pp 431.
- Falkowski PG, LaRoche J (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology* 27:8-14.
- Farber A, Young AJ, Ruban AV, Horton P, Jahns P (1997). Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants (The relationship between zeaxanthin conversion and nonphotochemical fluorescence quenching). *Plant Physiology* 115:1609-1618.
- Gagné G, Guertin M (1992). The early genetic response to light in the green unicellular alga *Chlamydomonas eugametos* grown under light dark cycles involves genes that represent direct responses to light and photosynthesis. *Plant Molecular Biology* 18:429-445.
- Ganeteg U, Kulheim C, Andersson J, Jansson S (2004). Is each light-harvesting complex protein important for plant fitness? *Plant physiology* 134: 502-509.
- García-Mendoza E (2000). Photoadaptation in microalgae: xanthophyll cycle and state transitions strategies. En tesis de Doctorado. Univesitetit van Amsterdam, pp 117.
- García-Mendoza E, Colombo-Pallotta MF (2007). The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different non-photochemical quenching control than higher plants. *New Phytologist* 173: 526–536.
- García-Mendoza E, Ocampo-Alvarez H, Govindjee (2011). Photoprotection in the brown alga *Macrocystis pyrifera*: evolutionary implications. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 104: 377-385.
- Gevaert F, Creach A, Davoult D, Holl A, Seuront L, Lemoine Y (2002). Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. *Plant Cell Environment* 25: 859-872.
- Granier F (1988) Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9:712-718
- Green BR (2007). Evolution of light harvesting antennas in an oxygen world. In: Falkowski PG, Knoll AH (eds) Evolution of primary producers in the sea. Elsevier Academic Press. London, UK. pp 37-53.
- Harker M, Berkaloff C, Lemoine Y, Britton G, Young AJ, Duval JC, Rmiki NE, Rousseau B (1999). Effects of light and desiccation on the operation of the xanthophylls cycle in two marine brown algae. *European Journal of Applied Phycology* 34: 35-42.
- Hoffman B, Senger H (1988). Kinetics of photosynthesis apparatus adaptation in *Scenedesmus obliquus* to change in irradiance and light quality. *Photochemical and Photobiology* 47:737-9.

- Holt NE, Fleming GR, Niyogi KK (2004). Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43:8281-8289.
- Holzwarth AR, Miloslavina Y, Nilkens M, Jahns P (2009). Identification of two quenching sites active in the regulation of photosynthetic light-harvesting studied by time-resolved fluorescence. *Chemical Physics Letters* 483:262-267.
- Horton P, Johnson MP, Perez-Bueno ML, Kiss AZ, Ruban AV (2008). Photosynthetic acclimation: does the dynamic structure and macroorganisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *FEBS Journal* 275:1069–1079.
- Humbeck K, Hoffman B, Senger H (1988). Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. *Planta* 173:205-12.
- Jackson GA (1977). Nutrients and production of giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, off southern California. *Limnology and Oceanography* 22: 979-95.
- Jahns P, Holzwarth AR (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817:182-193.
- Jahns P, Wehner A, Paulsen H, Hobe S (2001). De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *The Journal of Biological Chemistry* 276:22154-22159.
- Janssen M, Bathke K, Jurgen M, Krumbein WE, Rhiel E (2001). Changes in the photosynthetic apparatus of diatoms un response to low and high intensities. *International Microbiology* 4:27-33.
- Konotchick T, Dupont C, Valas RE, Badger JH, Allen A (2013). Transcriptomic analysis of metabolic function in the Giant Kelp, *Macrocystis pyrifera* across depth and season. *New Phytologist* 198:398-407.
- Koziol AG, Borza T, Ishida K, Keeling P, Lee RW, Durnford DG (2007). Tracing the evolution of the light harvesting antennae in chlorophyll a/b-containing organisms. *Plant Physiology* 143: 1802–1816.
- Kulheim C, Agren J, Jansson J (2002). Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science* 297:91–93.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larkum A (2003). Light harvesting systems in algae. In: Larkum A, Douglas SE, Raven JA (eds.) *Photosynthesis in algae*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands pp 277-304.
- Lavaud J (2007). Fast regulation of photosynthesis in diatoms: mechanisms, evolution and ecophysiology. *Functional Plant Science and Biotechnology* 1:267-287.

- Ledford HK, Baroli I, Shin JW, Fischer BB, Eggen RI, Niyogi KK (2004). Comparative profiling of lipid-soluble antioxidants and transcripts reveals two phases of photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics* 4:470-9.
- Lepetit B, Sturm S, Rogato A, Gruber A, Sachse M, Falciatore A, Kroth PG, Lavaud J (2013). High light acclimation in the secondary plastids containing diatom *Phaeodactylum tricorutum* is triggered by the redox state of the plastoquinone pool. *Plant Physiology* 161:853-65.
- Lepetit B, Volke D, Gilbert M, Wilhelm C, Goss R (2010). Evidence for the existence of one antenna-associated, lipid-dissolved and two protein-bound pools of diadinoxanthin cycle pigments in diatoms. *Plant Physiology* 154:1905-1920.
- Lepetit B, Volke D, Szabó M, Hoffman R, Garab G, Wilhelm C, Goss R (2007). Spectroscopic and molecular characterization of the oligomeric antenna of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Biochemistry* 46:9813-9822.
- Li XP, Muller-Moule P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002). PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 15222–15227.
- Liguori N, Roy LM, Opacic M, Durand G, Croce R (2013). Regulation of light harvesting in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*: The C-terminus of LHCSR is the knob of a dimmer switch. *Journal of the American Chemical Society* 135:18339-18342.
- Lüning K (1990). Seaweeds: their environment, biogeography, and ecophysiology. Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc. USA. pp 527.
- Morosinotto T, Caffari S, Dall'Osto L, Bassi R (2003). Mechanistic aspects of the xanthophylls dynamics in higher plant thylakoids. *Plant Physiology* 119: 347-354.
- Mou SL, Zhang XW, Ye NH, Dong MT, Liang CW, Liang Q, Miao JL, Xu D, Zheng Z (2012). Cloning and expression analysis of two different LhcSR genes involved in stress adaptation in an Antarctic microalga, *Chlamydomonas* sp. ICEL. *Extremophiles* 16:193–203.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001). Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. *Plant Physiology* 125:1558-1566.
- Nagai K, Yotskura N, Ikegami H, Kimura H, Morimoto K (2008). Protein extraction for 2-DE from the lamina of *Ecklonia kurome* (laminariales): recalcitrant tissue containing high levels of viscous polysaccharides. *Electrophoresis* 29:672-681.
- Naumann B, Busch A, Allmer J, Ostendorf E, Zeller M, Kirchhoff H, Hippler M (2007). Comparative quantitative proteomics to investigate the remodeling of bioenergetic pathways under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 21:3964-79.
- Nilkens ME, Kress P, Lambrev Y, Miloslavina M, Müller AR, Holzwarth P, Jahns (2010). Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical

quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:466–475.

Niyogi K, Li XP, Rosenberg V, Jung H (2004). Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 56: 375-382.

North W (1971). Introduction and background. In: North WJ (Ed). The biology of giant kelp beds (*Macrocystis*) in California. Beihefte zur Nova Hedwigia. Nova Hedwigia 32: 1-97.

Ocampo-Álvarez H, Mendoza-García E, Govindje (2013). Antagonist effect between violaxanthin and de-epoxidated pigments in nonphotochemical quenching induction in the qE deficient brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Biochimica et Biophysica Acta* 3:427-37.

Ohad I, Kyle DJ, Arntzen CJ (1984). Membrane-protein damage and repair – removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes. *Journal of Cell Biology* 99:481-485.

Osmond CB (1994) What is photoinhibition? some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) Photoinhibition of Photosynthesis. BIOS Scientific, Oxford pp.1-24.

Pascal AA, Liu ZF, Broess K, van Oort B, van Amerongen H, Wang C, Horton P, Robert B, Chang WR, Ruban A (2005). Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* 436:134-137.

Peers G, Truong T, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman A, Hippler M, Niyogi K (2009). An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462:518–522.

Pfündel E, Bilger W (1994). Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynthesis Research* 42:89-109.

Popovic R, Colbow K, Vidaver W, Bruce D (1983). Evolution of O<sub>2</sub> in brown algal chloroplasts. *Plant Physiology* 73:889-892.

Richard C, Ouellet H, Guertin M (2000). Characterization of the LI818 polypeptide from the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology* 42:303-316.

Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817:167-181.

Schaller S, Latowski D, Jemiola-Rzeminska M, Wilhelm C, Strzalka K, Goss R (2010). The main thylakoid membrane lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) promotes the de-epoxidation of violaxanthin associated with the light-harvesting complex of photosystem II (LHCII). *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:414-424.

Shrager J, Hauser C, Chang CW, Harris EH, Davies J, McDermott J, Tamse R, Zhang ZD, Grossman AR (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiology* 131:401-408.

Smith BM, Melis A (1987). Photosystem stoichiometry and excitation distribution in chloroplasts from surface and minus 20 meter blades of *Macrocystis pyrifera*, the giant kelp. *Plant Physiology* 84: 1325-1330.

Takahashi S, Badger, M (2011). Photoprotection in plants: a new light in photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16: 53-59.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76:4350-4354.

Tsugita A, Kamo M (1999). 2-D electrophoresis of plants proteins. *Methods in Molecular Biology* 112: 95-97

Van Heukelem L, Thomas C (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography* 910:31- 39.

Van Kooten O, Snel JF (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis research* 25:147-150

Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S, Cresti M (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24:2369-2375.

Wang W, Tai F, Chen S (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of separation science* 31:2032-2039.

Westerman M, Rhiel E (2005). Localization of fucoxanthin chlorophyll a/c binding polypeptides of the centric diatom *Cyclotella cryptica* by immune-electron microscopy. *Protoplasma* 225:217-223.

Wilhelm C, Selmar D (2011). Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: the physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 16:79-87.

Yamamoto H, Nayakama TOM, Chichester CO (1962). Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 97:168-173.

Zhang Z, Shrager J, Jain M, Chang CW, Vallon O, Grossman AR (2004). Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. *Eukaryot Cell* 5:1331-48.

Zhu S, Green B (2010). Photoprotection in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: role of the LI818 proteins in response to light stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:1449-1457.