



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD IRAPUATO
UNIDAD DE GENOMICA AVANZADA**

**“Diferencias en la respuesta transcripcional a estrés por déficit de
agua entre especies tolerantes e intolerantes a la desecación del
género *Selaginella*”**

Tesis que presenta:

IBQ. Gerardo Alejo Jacuinde

como requisito para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en la especialidad de Biotecnología de Plantas

Co-directores de Tesis:

**Dr. Luis Rafael Herrera Estrella
Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología e Ingeniería Metabólica de Plantas de la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV-Irapuato bajo la tutoría del Dr. Luis Herrera Estrella y la Dra. June Simpson Williamson, la asesoría del Dr. Octavio Martínez de la Vega y del Dr. John Délano Frier.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Luis Herrera** por todas sus enseñanzas en el análisis crítico en los proyectos de investigación, le doy gracias por recibirme nuevamente en su laboratorio y permitirme diseñar bajo su asesoría el proyecto de mi elección.

A la **Dra. June Simpson** por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo su apoyo y consejos ante las continuas dificultades que se presentaron durante la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca otorgada para la realización de este trabajo (No. Becario: 5708329).

A la **Dra. Sandra González**, ya que este trabajo no hubiera sido posible sin su participación tanto técnica como asesoría en la parte bioinformática.

Al **Dr. Octavio Martínez** y el **Dr. John Délano** por aceptar formar parte de mi comité tutorial, por todos sus consejos y sugerencias en vista de la mejora del proyecto.

Al **Dr. Klaus Mehlreter** por haber aceptado formar parte del proyecto, por el apoyo durante las colectas en campo, identificación de ejemplares y enseñanzas acerca de la naturaleza de este grupo de plantas.

A la **Dra. Alejandra Covarrubias** por recibirnos en su laboratorio y facilitarnos el equipo para las mediciones de fotosíntesis.

A todas aquellas personas que me apoyaron durante las colectas y en la obtención del material: a **Edgar Balcazar**, a la **M.C. Patricia Silva**, la **M.C. Aida Téllez**, a **Kevin Quintos**. En especial a mi hermano **Enrique** por todo el apoyo durante las colectas y en el laboratorio.

A **Araceli Oropeza** y **Katia Gil** por las facilidades en la disposición de equipos y materiales utilizados en este trabajo.

A todos los miembros de los **laboratorios LHE** y **JSW** por todas sus aportaciones, críticas y apoyo a lo largo de la maestría.

A mis amigos **Mary, Vla, Jules, Ina, Kevin y Vivis** por su compañía y entusiasmo durante todo este período de aprendizaje.

A todo el equipo del **Moreniupi** y las campeonas **Bohemias** por dejarme ser parte de su grupo y compartir buenos momentos.

A **Gil y Alejandra** por toda su alegría y apoyo en las buenas y en las malas.

A mi **papá** y mi **mamá**, quienes siempre me han impulsado para cumplir mis metas y lograr una vida mejor, gracias por su apoyo incondicional.

A **Gaby**, quien siempre ha consolado mis frustraciones científicas, por su dedicación y paciencia ante mis excentricidades, por todos esos grandiosos momentos que hemos compartido juntos.

INDICE GENERAL

	Pág.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	6
3.1 Sequía y tipos de tolerancia	6
3.2 Incidencia de la tolerancia a la desecación (TD)	7
3.3 Plantas de resurrección	9
3.4 Mecanismos y procesos involucrados en la TD	13
3.5 Análisis con herramientas del tipo “ómicas”	16
3.6 Plantas de resurrección del género <i>Selaginella</i>	18
IV. JUSTIFICACIÓN	21
V. OBJETIVOS	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Obtención del material	23
6.2 Determinación de la tolerancia a la desecación	23
6.3 Cinéticas de pérdida de agua	23
6.4 Cinéticas y colecta de tejido para extracción de RNA	23
6.5 Determinación del contenido de agua	24
6.6 Lecturas de actividad fotosintética	24
6.7 Extracción de RNA	25
6.8 Secuenciación	25
6.9 Procesamiento de lecturas crudas y ensamblado	25
6.10 Anotación funcional	26
6.11 Análisis de expresión diferencial	27
6.12 Enriquecimientos funcionales	27
VII. RESULTADOS	28
7.1 Identificación del grupo de estudio y obtención del material	28
7.2 Ciclos de deshidratación – rehidratación	33
7.3 Cinéticas de pérdida de agua entre especies	34
7.4 Lecturas de fotosíntesis	35

7.5 Cinéticas de pérdida de agua y toma de muestras para la realización de los transcriptomas	39
7.6 Extracciones e integridad del RNA	43
7.7 Resultados de la secuenciación y el preprocesamiento	45
7.8 Ensamblado de los transcriptomas	46
7.9 Anotación funcional	47
7.10 Análisis de expresión diferencial	51
7.11 Enriquecimientos funcionales	58
VIII. DISCUSIÓN	64
8.1 Género <i>Selaginella</i> como modelo de estudio y fuente para el descubrimiento de nuevas especies TD	64
8.2 Diferencias en la pérdida de agua y actividad fotosintética entre diferentes especies de <i>Selaginella</i>	66
8.3 La especie <i>Selaginella pallescens</i> , ¿es una especie tolerante o intolerante a la desecación?	68
8.4 Frondas de <i>Selaginella</i> como un primer acercamiento para obtener la TD en la planta completa	70
8.5 Diversidad génica dentro del género <i>Selaginella</i>	72
8.6 Diferencias transcripcionales en la respuesta a la deshidratación y rehidratación entre especies de <i>Selaginella</i>	74
8.7 Explicando la TD en términos de categorías funcionales	76
IX. CONCLUSIONES	83
X. PERSPECTIVAS	85
XI. REFERENCIAS	86
XII. ANEXOS	92

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 3.1 Filogenia de los principales grupos de plantas terrestres y su capacidad para tolerar la desecación.	8
FIGURA 3.2 Plantas de resurrección en estado desecado e hidratado.	10
FIGURA 3.3 Clasificación de la TD vegetativa de acuerdo a sus estrategias adaptativas.	11
FIGURA 3.4 Cambios en el nivel de hidratación en semillas y plantas de resurrección asociados con daño físico y cambios metabólicos ocurridos ante la pérdida de agua.	12
FIGURA 3.5 Respuestas de plantas de resurrección durante la desecación / rehidratación que han sido identificadas mediante enfoques “ómicos”.	18
FIGURA 3.6 Relaciones filogenéticas de plantas terrestres y características asociadas con su evolución.	19
FIGURA 3.7 Categorización funcional de los EST de <i>S. lepidophylla</i> .	20
FIGURA 7.1 Distribución de especies de <i>Selaginella</i> por estados.	30
FIGURA 7.2 Ciclos de deshidratación – rehidratación en frondas de <i>Selaginella</i> .	33
FIGURA 7.3 Pérdida de agua entre especies con morfología postrada y de roseta.	34
FIGURA 7.4 Actividad fotosintética durante la deshidratación y posterior rehidratación en frondas de diferentes especies de <i>Selaginella</i> .	36
FIGURA 7.5 Actividad fotosintética ajustada a la absorción neta de CO ₂ durante la deshidratación y posterior rehidratación en frondas de diferentes especies de <i>Selaginella</i> .	37
FIGURA 7.6 Actividad fotosintética asociada al contenido de agua en frondas de diferentes especies de <i>Selaginella</i> .	38
FIGURA 7.7 Diseño experimental de las cinéticas empleadas para toma de muestras usadas para la elaboración de los transcriptomas.	40
FIGURA 7.8 Cinéticas de pérdida de agua y líneas de tendencia en las cuatro especies empleadas para los transcriptomas.	41

FIGURA 7.9	Cambios morfológicos experimentados durante la deshidratación y aspecto a las 2 h después de la rehidratación en las cuatro especies empleadas para los transcriptomas.	42
FIGURA 7.10	Aspecto de los RNA extraídos de especies contrastantes en la TD.	43
FIGURA 7.11	Resultado del procesamiento de lecturas de la muestra “2h” de <i>S. pallescens</i> .	46
FIGURA 7.12	Número de genes con anotación en las principales categorías de cada una de las especies <i>Selaginella</i> analizadas.	49
FIGURA 7.13	Ejemplo del resultado de la anotación de un gen en particular de la especie <i>S. extensa</i> .	50
FIGURA 7.14	Comparación de las diferentes especies de <i>Selaginella</i> en base a los identificadores de <i>Arabidopsis</i> y <i>Selaginella</i> .	51
FIGURA 7.15	Genes diferencialmente expresados en <i>S. lepidophylla</i> durante la deshidratación y subsecuente rehidratación.	53
FIGURA 7.16	Genes diferencialmente expresados en <i>S. extensa</i> durante la deshidratación y subsecuente rehidratación.	54
FIGURA 7.17	Genes diferencialmente expresados en <i>S. pallescens</i> durante la deshidratación y subsecuente rehidratación.	55
FIGURA 7.18	Patrones de expresión de los genes diferencialmente expresados durante la deshidratación y subsecuente rehidratación.	56
FIGURA 7.19	Número de genes inducidos diferencialmente expresados entre especies.	57
FIGURA 7.20	Categorías funcionales enriquecidas de genes inducidos en <i>S. lepidophylla</i> .	59
FIGURA 7.21	Categorías funcionales enriquecidas de genes inducidos en <i>S. extensa</i> .	60
FIGURA 7.22	Categorías funcionales enriquecidas de genes inducidos en <i>S. pallescens</i> .	61
FIGURA 7.23	Categorías funcionales enriquecidas en común y únicas a <i>S. extensa</i> y <i>S. lepidophylla</i> .	62
FIGURA 7.24	Categorías funcionales enriquecidas en común y únicas a <i>S. pallescens</i> y <i>S. lepidophylla</i> .	63

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 3.1 Plantas de resurrección más estudiadas.	9
TABLA 6.1 Bases de datos empleadas en la anotación.	26
TABLA 7.1 Plantas de resurrección reportadas en México	28
TABLA 7.2 Especies del género <i>Selaginella</i> que han sido identificadas en México.	29
TABLA 7.3 Precipitación anual por estados en los últimos 5 años.	31
TABLA 7.4 Ejemplares colectados en campo y material donado.	32
TABLA 7.5 Valores de integridad (RIN) de los RNA de las muestras secuenciadas.	44
TABLA 7.6 Número de lecturas de cada librería antes y después de ser procesadas.	45
TABLA 7.7 Resultados del ensamblado de los transcriptomas de especies de <i>Selaginella</i> contrastantes en la morfología y la TD.	47
TABLA 7.8 Resultados de la anotación de los transcriptomas de especies de <i>Selaginella</i> contrastantes en la morfología y la TD.	48
TABLA 7.9 Número de genes diferencialmente expresados por condición en especies de <i>Selaginella</i> contrastantes en la morfología y la TD.	52

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad
EST	“Expressed Sequences Tags”
GABA	“ γ -aminobutyric acid”
HSP	“Heat Shock Proteins”
LEA	“Late Embryogenesis Abundant”
no-TD	Intolerante o no tolerante a la desecación
pb	Pares de bases
RIN	“RNA Integrity Number”
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TD	Tolerante a la desecación

I. RESUMEN

La sequía es el tipo de estrés abiótico que causa las mayores pérdidas en la productividad agrícola alrededor del mundo. Debido al cambio climático cada vez es más frecuente la incidencia de períodos de sequía y el incremento de tierras áridas. Por otro lado, es necesario considerar el problema de seguridad alimenticia que enfrentaremos en las próximas décadas por el incremento poblacional. A pesar del gran avance en el entendimiento de las respuestas en las plantas a la pérdida de agua y los mecanismos de protección o reparación del daño consecuencia del déficit de agua, no se han logrado obtener cultivos tolerantes que puedan soportar la sequía extrema. Por ésta razón es esencial una mayor comprensión de la tolerancia al déficit de agua en fuentes naturales que exitosamente han desarrollado adaptaciones y mecanismos para tolerar la desecación (definida como la habilidad de sobrevivir a la pérdida casi completa del agua en la célula), como es el caso de las plantas de resurrección. Algunos estudios proponen que los mecanismos de tolerancia en este tipo de plantas son adaptaciones reclutadas de otros procesos no necesariamente involucrados en la tolerancia al déficit de agua, por lo que suelen estar presentes en las especies intolerantes. Teniendo como base esta idea, creemos que el potencial para inducir tolerancia en plantas sensibles a la desecación puede residir en ellas mismas, teniendo como diferencia principal con las plantas de resurrección la regulación de los genes involucrados en la tolerancia a la desecación. El presente trabajo aporta información nueva acerca de la tolerancia a la desecación en varias especies del género *Selaginella*, las cuales mostraron diferencias en la pérdida de agua y respuesta en la rehidratación, así como las respuestas transcripcionales producidas bajo estas condiciones en diferentes genotipos. La comparación entre especies tolerantes a la desecación con morfologías contrastantes nos permitió distinguir entre los mecanismos esenciales para tolerar el estrés hídrico. Estos incluyeron principalmente la inducción de sistemas antioxidantes, cambios en el metabolismo secundario y de aminoácidos, señalización, inducción de proteínas de transporte y modificaciones en el metabolismo de azúcares. Estos procesos no son necesariamente dependientes de la morfología del organismo, y en la mayoría de los casos no estuvieron presentes o tuvieron baja expresión en las especies intolerantes. Este trabajo sugiere las respuestas más significativas a la pérdida de agua más significativas en las que debemos enfocarnos en el diseño de cultivos con la finalidad de incrementar la tolerancia al estrés por déficit de agua.

ABSTRACT

Drought is the type of abiotic stress causing the highest losses in agricultural productivity worldwide. Due to climate change the incidence of dry periods is more frequent, as well as the increment of dry areas. On the other hand, it is necessary to consider the problem of food supply that will be faced in the next decades because of population growth. Despite advances in the understanding of the plant responses to water loss and the protection mechanisms or damage repair as a consequence of water deficit, there are still no tolerant crops that can deal with extreme drought. For that reason, obtain a higher comprehension of the water deficit tolerance in natural resources is essential to successfully develop adaptations and mechanisms to tolerate desiccation (defined as the ability to survive the loss of almost the totality of water in the cell), as is the case of the so called resurrection plants. Some studies propose that the tolerance mechanisms in these kinds of plants are adaptations recruited from other process not necessarily involved in water deficit tolerance, so that they are usually also present in intolerant species. On the basis of this idea, we believe that the potential to induce tolerance to desiccation in sensitive plants could be inherent with the main difference with resurrection plants being the regulation of the genes involved in desiccation tolerance. The present study contributes with novel information about the desiccation tolerance in several species of the *Selaginella* genus, which showed differences in water loss rates and in their response to rehydration, as well as the transcriptional responses produced under these conditions in the different genotypes. The comparison between desiccation tolerant species with contrasting morphologies allowed us to distinguish the essential mechanisms to tolerate water stress. These mostly included the induction of antioxidant systems, changes in secondary metabolism, amino acid metabolism and signaling, induction of transport proteins, and modified carbohydrate metabolism. These processes not necessarily dependent on the organisms morphology, that in most cases they were not present or had low expression in intolerant species. This study suggest the most significant responses to water loss that should be the focus for future crop design strategies, in order to enhance tolerance to water stress.

II. INTRODUCCION

La seguridad alimenticia para las próximas décadas está en riesgo debido al cambio climático y el crecimiento poblacional. Algunos estudios estiman que la producción global de alimentos deberá incrementarse en un 70% para cubrir la demanda de una población de alrededor de 9 billones en 2050 (McKersie, 2015).

La principal fuente de alimento para la población global es la agricultura, siendo los cereales el componente de mayor consumo en la dieta actual (173 kg/persona/año) según datos de la FAO (<http://www.fao.org/docrep/006/Y4683E/y4683e06.htm#TopOfPage>, último acceso 21 de junio 2016). Las plantas están expuestas a diferentes estímulos ambientales y condiciones que pueden afectar su desarrollo como son la sequía, altas o bajas temperaturas, carencia de nutrientes, interacciones con patógenos, entre muchas otras (Suzuki et al., 2014). Entre los diferentes tipos de estrés abiótico, la sequía está considerada como el estrés que más afecta la agricultura, ya que puede producir pérdidas en el rendimiento de hasta el 50% en los principales cultivos (Hu y Xiong, 2014). Es difícil estimar las pérdidas debido a la sequía alrededor del mundo, pero se sabe que se trata de varios millones de toneladas con un valor económico considerable (Lawlor, 2013).

Nuestro país se encuentra entre las regiones que han sufrido períodos de sequía en las últimas décadas. Observaciones del Monitor de Sequía de México (<http://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/monitor-de-sequia/monitor-de-sequia-en-mexico>, último acceso 22 de junio 2016) de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), señalan que en la última década ha habido varios años (2006 – 2009, 2011 y 2013) en los que más de la mitad del territorio nacional ha sido afectado por algún tipo de sequía que va desde anormalmente seco hasta sequía excepcional. En base a modelos con datos recopilados por el “World Climate Research Programme” (WCRP), de acuerdo a sus proyecciones este fenómeno se presentará con mayor frecuencia e intensidad en los próximos años en regiones como Centro América y México (Orlowsky y Seneviratne, 2013).

Otras fuentes como el Centro para el Desarrollo Global (<http://www.cgdev.org/page/mapping-impacts-climate-change>, último acceso 6 de julio

2016) sitúan a nuestro país en el lugar 28 de un ranking elaborado con información de más de 230 países, al considerar que se encuentra en una situación crítica ante el cambio climático y su efecto en el riesgo de pérdida de la productividad agrícola.

Ante esta problemática, resulta necesaria la generación de cultivos que tengan un incremento (o por lo menos estabilidad) en el rendimiento bajo condiciones de deficiencia de agua o inclusive con una menor cantidad de insumos. Lo anterior mediante herramientas como la selección asistida por marcadores moleculares (MAS), mutagénesis o ingeniería genética (McKersie, 2015).

Existen muchos trabajos donde se muestran varios intentos por generar cultivos que toleren la sequía (Hu y Xiong, 2014; Ashraf, 2010; Mir et al., 2012; López-Arredondo et al., 2015) pero pocos han sido probados en campo y no siempre han tenido los resultados esperados, ya que a la fecha solo se comercializan dos productos como tolerantes a la sequía: un híbrido de maíz denominado “DroughtGard” de la compañía Monsanto, cuyo cultivo ya está aprobado para Canadá, Japón y EUA, y una caña de azúcar desarrollada por la compañía PT Perkebunan Nusantara XI, para su cultivo en Indonesia (<http://www.isaaa.org/default.asp>, último acceso 22 de junio 2016). Cabe mencionar que, en ambos casos, la tolerancia es conferida gracias a la introducción de un solo gen.

A pesar de que se tiene un gran avance en el entendimiento de la respuesta a la pérdida de agua, y se conocen varios mecanismos y metabolitos involucrados en la tolerancia a este tipo de estrés, es necesario realizar más estudios para poder desarrollar cultivos realmente tolerantes a la sequía.

La mayoría de las plantas complejas son susceptibles a la sequía (incluyendo los principales cultivos de interés agronómico) y si sus contenidos de agua caen más allá del 30-60% mueren (Dinakar y Bartels, 2013). Sin embargo, existe un pequeño grupo de plantas conocidas como plantas de resurrección, que pueden tolerar la pérdida casi completa de su agua celular alcanzando contenidos relativos de agua del 5 al 10%, o inclusive menores (Proctor y Pence, 2002; Bartels y Hussain, 2011). Además, pueden permanecer secas durante períodos de

tiempos prolongados, que pueden llegar a ser de varios años (Walters et al., 2005), y retomar su ciclo de vida normal una vez que se rehidratan.

Por dicha razón, este tipo de plantas representa una innovadora fuente génica para la creación de cultivos tolerantes a la sequía. Además, su estudio permitirá una mejor comprensión de la respuesta a este estímulo y de todos aquellos procesos involucrados en la supervivencia ante la pérdida de agua. Algunos estudios han mostrado que la respuesta a la pérdida de agua es muy similar entre especies tolerantes e intolerantes a la desecación (Rodriguez *et al.*, 2010; Illing *et al.*, 2005; Bartels y Hussain, 2011). En base a esto, nosotros proponemos que la tolerancia puede estar conferida por cuestiones cinéticas que incluyen la temporalidad (tiempos en los que se activa una respuesta a nivel de expresión génica ante el estrés) o un nivel cuantitativo (mayores o menores niveles de expresión) de genes clave involucrados en la tolerancia.

En el presente trabajo se realizó un estudio comparativo entre especies filogenéticamente cercanas que nos permitió discernir entre los procesos involucrados en la tolerancia a la desecación. Mediante este trabajo se generaron las bases para el diseño de cultivos tolerantes a la sequía centrándose en las respuestas esenciales a la desecación como una posible alternativa ante la problemática derivada del cambio climático y el crecimiento poblacional.

III. ANTECEDENTES

3.1 Sequía y tipos de tolerancia

La sequía comúnmente es definida en términos meteorológicos, como la deficiencia en el suministro de agua (específicamente precipitación) comparada con los niveles normales en un período de tiempo (Lawlor, 2013). Sin embargo, también puede ser definida haciendo énfasis en la actividad humana o aspectos sociales (sequía agrícola, hidrológica o socioeconómica). Para los fines de este trabajo, se aplicará el término desde un punto de vista agronómico; es decir, como la deficiencia de agua que perjudica el crecimiento y productividad de las plantas comparada con el suministro requerido para alcanzar un crecimiento óptimo o máximo (Wilhite y Buchanan-Smith, 2005; Lawlor, 2013).

Los mecanismos de resistencia a la sequía suelen ser divididos en cuatro tipos (Lawlor, 2013; Fang y Xiong, 2015):

- Escape de la sequía: Caracterizada por el tiempo y ciclo de vida de la planta que coincide con los periodos de disponibilidad del suministro de agua.
- Evasión de la sequía: Las plantas pueden crecer en periodos de sequía manteniendo potenciales de agua altos mediante mecanismos para restringir la pérdida de agua (cierre de estomas y reducción del área foliar), incrementando el suministro de agua (sistema radicular más denso y profundo), almacenamiento de agua en órganos, entre otros. Se podría considerar que en este tipo de estrategia, las plantas hacen un uso eficiente del agua.
- Supervivencia / recuperación de la sequía: Las células, tejidos y órganos entran en un estado quiescente después de haber sido expuestos a sequía, siendo capaces de mantener funciones celulares claves.
- Tolerancia a la sequía: Caracterizada principalmente por actuar a nivel metabólico, ya que pueden mantener hasta cierto nivel las actividades fisiológicas aún en condiciones de sequía severa, involucrando la regulación de cientos de genes y de rutas metabólicas para reducir o reparar el daño producido por este tipo de estrés. Algunos ejemplos son la activación de sistemas antioxidantes y síntesis de osmoreguladores, entre otros.

Este es un sistema de clasificación sugerido para caracterizar el tipo de estrategia que presentan algunas plantas ante el déficit de agua. Sin embargo, no son excluyentes uno de otro ya que las plantas pueden emplear una combinación de estrategias o éstas pueden ser implementadas dependiendo de la severidad o progresión de la sequía.

Como parte de la tolerancia a la sequía, uno de sus mecanismos es la tolerancia a la desecación (TD), la cual no debe de ser confundida con la sequía, ya que muchos organismos toleran la sequía pero no la desecación. La primera se refiere a la baja disponibilidad de agua en el ambiente, mientras que la desecación involucra un bajo contenido de agua en las células (Alpert, 2005). Podemos definir la TD como la habilidad de un organismo para secarse en equilibrio con el aire, sobreviviendo a la pérdida casi completa de su agua celular, para posteriormente recuperarse y retomar su metabolismo normal al rehidratarse (Farrant *et al.*, 2007; Proctor y Pence, 2002).

La TD puede considerarse como el secado completo, o hasta la detención de todo proceso metabólico (por lo menos hasta que no se detecta actividad metabólica). Una definición cuantitativa de la desecación completa es el secado hasta valores menores a 0.1 g de H₂O por gramo de peso seco (10% de contenido de agua). El umbral de un contenido de agua del 10% tiene cierta relevancia biológica pues corresponde al punto en el que no hay suficiente agua para formar una monocapa alrededor de las macromoléculas, deteniendo con ello las reacciones enzimáticas y por tanto el metabolismo (Alpert, 2005).

3.2 Incidencia de la tolerancia a la desecación (TD)

La TD en células vegetativas es una característica común en los clados menos complejos como son algas terrestres, líquenes y briofitas (p. ej. musgos, antoceros y hepáticas). En la mayoría de las plantas vasculares es normal encontrar esta característica en estructuras reproductivas como semillas, polen y esporas, pero es inusual en tejidos vegetativos de pteridofitas y angiospermas, y está ausente en gimnospermas (Proctor y Pence, 2002; Illing *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2000; Alpert, 2005).

Tan solo en semillas de angiospermas modernas de las cuales se tiene información, más del 90% pueden tolerar la desecación (semillas denominadas ortodoxas), contrastando con alrededor de 330 especies de plantas vasculares documentadas como plantas de resurrección al presentar TD vegetativa, representando menos del 0.15% del total de plantas vasculares (Costa *et al.*, 2016; Proctor y Pence, 2002).

La TD en tejidos vegetativos de las plantas vasculares está presente en grupos de plantas distintos, lo que representa eventos evolutivos independientes (**Figura 3.1**). La TD fue un paso crucial y necesario para la colonización de los nichos terrestres por las plantas primitivas. Sin embargo, conforme las plantas fueron evolucionando esta característica se perdió en las plantas vasculares (traqueófitas) al favorecer la internalización de las relaciones de agua y su transporte. Además de que el tipo de tolerancia que presentan los clados ancestrales conlleva un costo metabólico el cual fue sustituido por tasas de crecimiento más aceleradas (Oliver *et al.*, 2000).

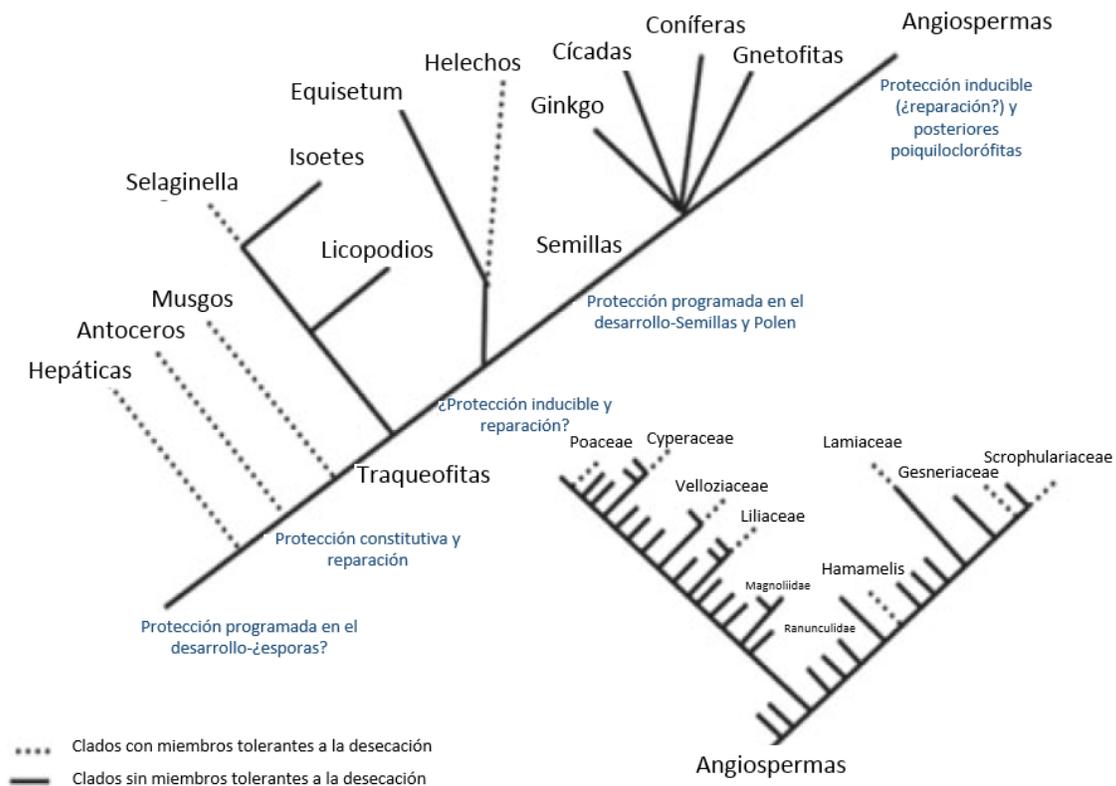


FIGURA 3.1 Filogenia de los principales grupos de plantas terrestres y su capacidad para tolerar la desecación. En la parte inferior derecha de la figura se indican las familias de Angiospermas con miembros reportados como TD. Modificada de Oliver (2007).

3.3 Plantas de resurrección

Las plantas vasculares que presentan TD en tejidos vegetativos son conocidas como plantas de resurrección. Este grupo es denominado como “Plantas de resurrección” por el aspecto del tejido cuando se encuentran secas aparentando estar muertas, el cual se revitaliza o resucita cuando las plantas son hidratadas (**Figura 3.2**). Algunas de las más estudiadas se muestran en la **Tabla 3.1**.

TABLA 3.1 Plantas de resurrección más estudiadas.

Nombre	Clase	Originaria	Estrategia de TD*
<i>Craterostigma plantagineum</i>	Dicotiledónea	África del Sur	H
<i>Craterostigma wilmsii</i>	Dicotiledónea	Sudáfrica	H
<i>Lindernia brevidens</i>	Dicotiledónea	Este de África	H
<i>Myrothamnus flabellifolia</i>	Dicotiledónea	África del Sur	H
<i>Boea hygrometrica</i>	Dicotiledónea	China	H
<i>Ramonda serbica</i>	Dicotiledónea	Serbia	H
<i>Haberlea rhodopensis</i>	Dicotiledónea	Bulgaria y Serbia	H
<i>Xerophyta viscosa</i>	Monocotiledónea	África del Sur	P
<i>Xerophyta humilis</i>	Monocotiledónea	África del Sur	P
<i>Sporobolus stapfianus</i>	Monocotiledónea	África del Sur	-
<i>Eragrostis nindensis</i>	Monocotiledónea	África del Sur	P
<i>Selaginella bryopteris</i>	Licofita	India	H
<i>Selaginella tamariscina</i>	Licofita	China	H
<i>Selaginella lepidophylla</i>	Licofita	Norte y Sudamérica	H

*La estrategia de TD es en base a su retención del aparato fotosintético y clorofila, Homoioclorofilas (H), o el desmantelamiento de este, Poiquiloclorofilas (P). Extraída de Dinakar *et al.* (2012)

La **Figura 3.2** muestra una característica común a varias plantas de resurrección como son los cambios morfológicos en respuesta a la pérdida de agua, específicamente el enrollamiento o plegamiento de las hojas, una adaptación que limita el daño oxidativo por la radiación ultravioleta (Bartels y Hussain, 2011). Las adaptaciones morfológicas también tienen la función de disminuir el daño térmico como sugieren estudios en la planta *S. lepidophylla* en la que se muestra que el enrollamiento de sus tallos en espiral ocurre de una manera ordenada debido a un gradiente de agua que se genera a lo largo del tallo, además de tener una diferencia en la capacidad de retención de agua en las estructuras internas (tejido joven) comparado con las externas (Rafsanjani *et al.*, 2015).



FIGURA 3.2 Plantas de resurrección en estado desecado e hidratado. Fotografías de *Boea hygrometrica* y *Craterostigma wilmsii* en su hábitat natural en período de sequía (A y C, respectivamente) y en estado hidratado (B y D, respectivamente). *Craterostigma plantagineum* y *Myrothamnus flabelifolia* en un contenido relativo de agua del 5% aproximadamente (E y G, respectivamente) y 24 h después de la rehidratación (F) y su estado hidratado (H). Las imágenes A y B fueron tomadas de Mitra *et al.* (2013); C, D, G y H de Farrant *et al.* (2007); E y F de Rodríguez *et al.* (2010).

Las plantas tolerantes a la desecación suelen ser clasificadas en base a mecanismos constitutivos o inducibles, o si poseen la capacidad de retener o no su aparato fotosintético y clorofila (**Figura 3.3**). Si presentan una tolerancia constitutiva que les permite sobrevivir sin importar la velocidad de la pérdida del agua se denominan como “completamente tolerantes a la desecación”. Aquellas que poseen una serie de mecanismos inducibles activados cuando la pérdida del agua es más lenta o gradual se les denomina como plantas con “tolerancia a la desecación modificada”. Esta última incluye a las plantas vasculares. Como se mencionó anteriormente, este tipo de plantas también suelen ser divididas según su capacidad de mantener su aparato fotosintético. Las especies homoiclorofilas retienen su aparato fotosintético y clorofila, teniendo la capacidad de retomar la fotosíntesis al poco tiempo después de ser rehidratadas, siendo características de ambientes en los que períodos húmedos y secos suelen cambiar rápidamente. A diferencia de las del tipo poiquiloclorofilas, que desmantelan la estructura del cloroplasto, las cuales son propias de hábitats con períodos de humedad más prolongados (Toldi *et al.*, 2009).

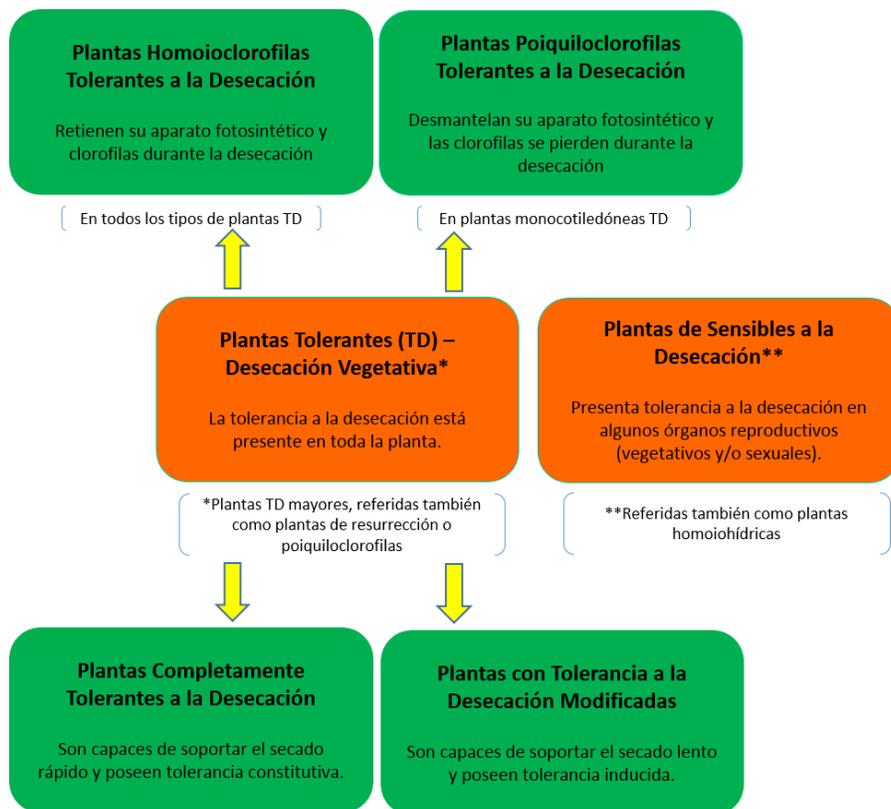


FIGURA 3.3 Clasificación de la TD vegetativa de acuerdo a sus estrategias adaptativas. Modificada de Toldi *et al.* (2009).

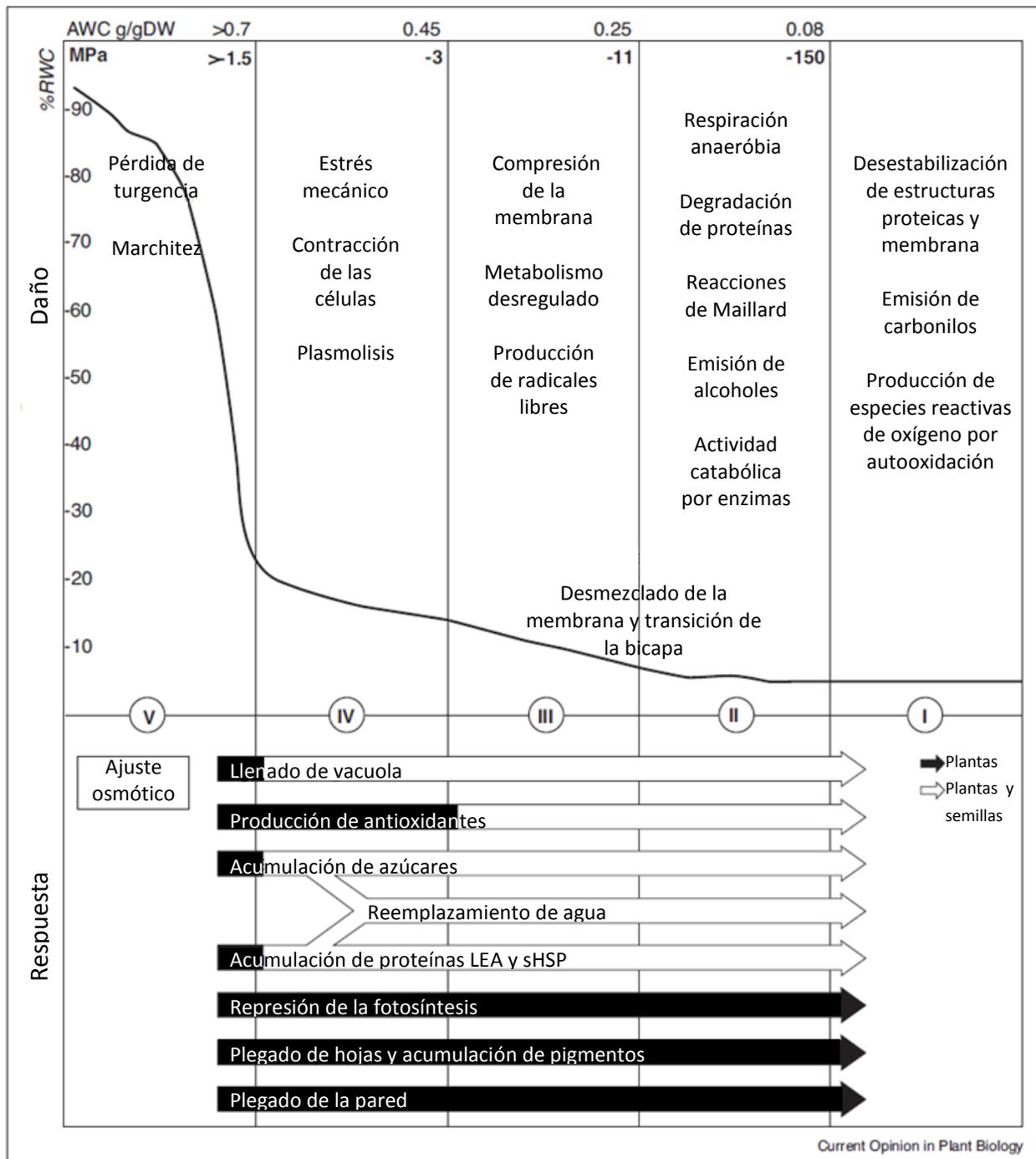


FIGURA 3.4 Cambios en el nivel de hidratación en semillas y plantas de resurrección asociados con daño físico y cambios metabólicos ocurridos ante la pérdida de agua. RWC: contenido de agua relativo; AWC/DW: gramos de agua por gramos de peso seco (por sus siglas en inglés); MPa: Megapascal, medida del potencial de agua; LEA, “Late Embryogenesis Abundant”; sHSP, “small Heat Shock Proteins”. Modificada de Farrant y Moore (2007).

3.4 Mecanismos y procesos involucrados en la TD

La pérdida de agua produce diferentes tipos de estrés conforme el tejido se va secando o alcanza contenidos de agua más bajos, lo que ha sido objeto de varios estudios utilizando semillas y plantas de resurrección, ya que ambas experimentan procesos similares (**Figura 3.4**).

La **Figura 3.4** también muestra algunas de las respuestas ante la pérdida de agua. Algunos estudios se han enfocado en los mecanismos y estrategias que presentan en común las plantas de resurrección para la protección y mantenimiento de la integridad celular (Dinakar *et al.*, 2012; Bartels y Hussain, 2011). Algunos de éstos se comentan a continuación:

- *Cambios morfológicos*

Esta adaptación es esencial para sobrevivir la desecación como se menciona anteriormente, se piensa que limita el daño por estrés oxidativo causado por la radiación UV.

- *Modificaciones en la pared celular*

La pérdida de agua tiene el efecto de reducir el volumen de los tejidos al contraer las células generando un estrés mecánico severo. Debido a que la pared celular presenta muy baja elasticidad se produce una tensión entre la membrana plasmática y la pared celular. Si la membrana llega a separarse puede ser letal al producirse un daño irreversible. Para lograr una estabilización mecánica durante la desecación las paredes celulares de las plantas de resurrección tienen la propiedad de plegarse. Esta capacidad ha sido asociada con un incremento significativo de xiloglucanos y pectinas no esterificadas y una reducción de glucosa en la fracción de hemicelulosa. También se presenta un incremento en la flexibilidad, debido a la reestructuración de la pared celular por actividad de las expansinas, que actúan rompiendo los puentes de hidrógeno entre los polímeros de celulosa y hemicelulosa.

- *Fluidez de la membrana*

La fluidez de la membrana es importante al contribuir a la flexibilidad de la célula. Se sabe que a un mayor grado de poliinsaturación en los fosfolípidos de membrana resulta en una mayor fluidez. En plantas vasculares TD, en general se ha observado una tendencia a un decremento en lípidos totales así como el nivel de insaturación de

fosfolípidos individuales. Sin embargo, también se ha reportado la tendencia contraria por lo que resulta necesario hacer más estudios.

- *Acumulación de proteínas de protección*

Una de los principales mecanismos en la TD en plantas de resurrección está dado por el rol de protección de las proteínas LEA (“Late Embryogenesis Abundant”). Algunas de las funciones que se han predicho para este grupo de proteínas son protección del DNA, estabilización de los filamentos del citoesqueleto, además de actuar como chaperonas moleculares para proteger la conformación de las proteínas y su actividad. También se ha visto que estas proteínas actúan en conjunto con azúcares como trehalosa para prevenir agregación de proteínas. La síntesis de otro tipo de proteínas, las HSP (“Heat Shock Proteins”), coincide también con la adquisición de la TD y son inducidas por los mismos tipos de estrés que las proteínas LEA. Este tipo de proteínas pueden compensar la pérdida de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua.

- *Acumulación de carbohidratos*

Tal como menciona Dinakar *et al.* (2012): “la habilidad de la planta para sobrevivir la desecación se correlaciona con la acumulación de carbohidratos”. Entre las funciones de los azúcares (sacarosa, trehalosa, rafinosa, glucosa, entre otros) durante la deshidratación, se incluye su papel en el ajuste osmótico. La vitrificación del citoplasma (resultado de la interacción de azúcares con otras moléculas) ralentiza las reacciones químicas limitando la producción de radicales libres. También protege los organelos contra el daño y previene los cambios conformacionales de proteínas y la fusión de membranas. Especies del género *Craterostigma* poseen un novedoso mecanismo de acumulación de sacarosa, al acumular un azúcar de ocho carbonos (2-octulosa) en estado hidratado hasta que comienza la deshidratación, periodo en el que se convierte en sacarosa.

- *Inducción de sistemas antioxidantes*

En condiciones de deficiencia de agua la planta cierra los estomas, limitando el suministro de CO₂ e inhibiendo la fijación de carbono. Dado que la clorofila continua transfiriendo electrones, la falta de CO₂ para alimentar el Ciclo de Calvin, genera singletes de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunos de los

mecanismos para eliminar ROS son la acumulación de antioxidantes (ascorbato, glutatión, α -tocoferol, etc.) o enzimas antioxidantes (p. ej. peroxiredoxinas).

- *Fotosíntesis*

Las plantas de resurrección angiospermas detienen la fotosíntesis durante la desecación. En este sentido las especies poiquiloclorofilas tiene la ventaja de que al degradar la clorofila evitan la acumulación de especies reactivas de oxígeno. A su vez, las especies homoioclorofilas necesitan implementar mecanismos de protección. Algunos de los mecanismos de protección conocidos son la inducción de proteínas del tipo ELIPs (“Early Light-Inducible Proteins”), las cuales tienen la función de proteger contra el daño fotooxidativo. En *C. plantagineum* se identificó una familia de genes nucleares (CpPTP) con la habilidad de interactuar con DNA de plástidos y de participar en la represión de genes codificados en cloroplasto o en la protección del DNA durante la deshidratación.

- *Regulación por ácido abscísico*

En la mayoría de las plantas de resurrección estudiadas a la fecha se ha involucrado al ácido abscísico (ABA) en la adquisición de la TD al estimular la síntesis de proteínas relacionadas a la tolerancia como algunas del tipo LEA. Supuestamente el ABA en las plantas de resurrección desempeña una función similar a la observada en la respuesta a la deshidratación en especies intolerantes como *Arabidopsis*.

- *Factores de transcripción y señalización*

Algunos factores de transcripción que han sido identificados en plantas de resurrección son del tipo MYB, HD-Zip y bZip. Uno de ellos, el gen *cpm10* (factor de transcripción de la familia MYB), al ser introducido en *Arabidopsis* incrementó su tolerancia a estrés por sequía y al estrés salino. También han sido identificados factores de transcripción que regulan la respuesta al estrés por déficit hídrico en plantas intolerantes como son algunos de la familia AP2/EREBP (al cual pertenece DREB/CBF). Recientemente se publicó el transcriptoma de desecación y rehidratación de *M. flabellifolia* haciendo énfasis en todos los factores de transcripción y quinasas que participan en el proceso de tolerancia (Ma *et al.*, 2015).

- *Acuaporinas*
Estas proteínas de membrana forman canales que permiten el transporte de agua. Están involucrados en las relaciones hídricas y por tanto en la TD. En plantas de resurrección se han identificado genes que codifican para TIP (“Tonoplast Intrinsic Protein”) y PIP (“Plasma Membrane Intrinsic Protein”) diferencialmente expresados en respuesta a la deshidratación. En hojas secas de *E. nindensis* se identificó TIP 3;1, semejante a proteínas que eran consideradas exclusivas de semillas ortodoxas (semillas que pueden tolerar la desecación); estas proteínas participan en la permeabilidad de agua en el tonoplasto durante la rehidratación y además ayudan en la movilización de azúcares, proteínas y otros solutos acumulados dentro de las vacuolas.
- *Síntesis de solutos compatibles*
Se ha propuesto que la acumulación de solutos compatibles protege a las células a través de la estabilización de los constituyentes citoplasmáticos y el secuestro de iones. Esto debido a la exclusión preferencial en la superficie de proteínas y membranas. Además de que su acumulación resulta en un incremento de la osmolaridad, produciendo un flujo de agua hacia la célula o al menos una reducción en su salida. Algunos de los solutos compatibles que acumulan las plantas en la deshidratación son: prolina, manitol, glicina betaina, inositol, glucosa-glicerol, entre otros.

Cabe mencionar que los mecanismos anteriores son sólo algunas de las respuestas ante la pérdida de agua, aunque no son las únicas y dependiendo de la especie puede favorecerse un proceso o ruta metabólica.

3.5 Análisis con herramientas del tipo “ómicas”

Por la naturaleza de las plantas de resurrección no ha sido posible desarrollar un sistema que permita la generación de mutantes para la realización de análisis funcionales. Se tienen reportes de trabajos en los que exitosamente han logrado transformar las plantas pero generalmente estos procedimientos presentan varias dificultades (Toldi *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, la mayoría de las plantas de resurrección son poliploides con genomas

relativamente grandes por lo que pocas han sido secuenciadas (Dinakar y Bartels, 2013). El estudio de las plantas de resurrección nos permitirá dilucidar los mecanismos necesarios para la TD así como una alternativa para la generación de cultivos con una mayor tolerancia al estrés por déficit de agua, y para lograrlo se han realizado varios estudios con un enfoque “ómico”.

Los estudios antes mencionados incluyen análisis transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos. Al ser considerados en conjunto se ha visto que las plantas de resurrección presentan algunas respuestas en común como muestra la **Figura 3.5**. A la fecha se han realizado estudios a nivel de transcriptoma de las especies *C. plantagineum* (Rodríguez *et al.*, 2010), *H. rhodopensis* (Gechev *et al.*, 2013), *M. flabellifolia* (Ma *et al.*, 2015) y *B. hygrometrica* (Zhu *et al.*, 2015). En estos estudios, se han encontrado cambios en la expresión génica como respuesta a la pérdida de agua de procesos ya caracterizados como necesarios para la TD. De modo que comparando las respuestas entre *C. plantagineum* y *H. rhodopensis* se podrían resaltar algunas, como la inducción de enzimas involucradas en la síntesis de sacarosa y rafinosa, de genes de expansinas para modificar la plasticidad de la pared celular, así como la expresión tanto constitutiva como inducible de proteínas del tipo LEA y de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas y catalasas, entre otros (Dinakar y Bartels, 2013).

Cabe resaltar que una gran proporción de los genes que responden a la desecación en las plantas de resurrección están presentes en las plantas intolerantes, y estudios como el de Rodríguez *et al.* (2010) mencionan que la respuesta a la deshidratación en este tipo de plantas es, en general, muy similar a la observada en las plantas intolerantes.

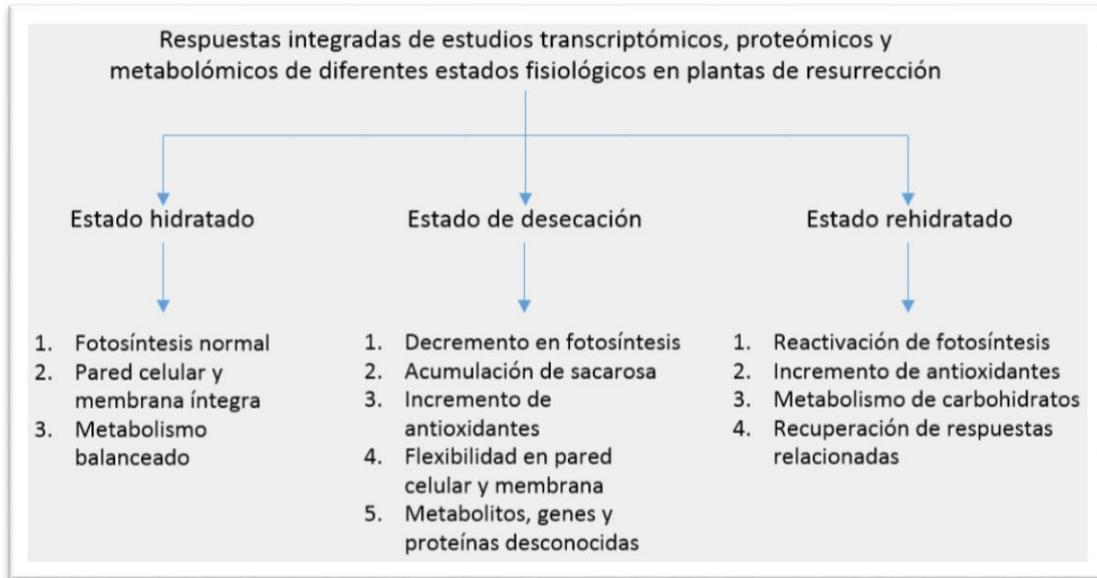


FIGURA 3.5 Respuestas de plantas de resurrección durante la desecación / rehidratación que han sido identificadas mediante enfoques “ómicos”. Extraída de Dinakar y Bartels (2013).

3.6 Plantas de resurrección del género *Selaginella*

El primer reporte de una planta de resurrección fue hecho en el año 1837, cuando se describió la capacidad de *S. lepidophylla* de tolerar la pérdida de agua (Proctor y Pence, 2002). Esta especie es nativa del desierto de Chihuahua (Rafsanjani *et al.*, 2015), aunque se puede encontrar en muchos estados de la República Mexicana y en algunas zonas de los Estados Unidos. *S. lepidophylla* también conocida como “Flor de Piedra”, “Siempreviva” o “Rosa de Jericó” (Pampurova y Van Dijck, 2014), forma parte de uno de los géneros de plantas vasculares más grandes, ya que el número estimado de miembros es de alrededor de 700 especies, las cuales están presentes en casi todo tipo de ambientes (Banks, 2009).

El principal interés científico en este género se ha centrado en el entendimiento de la evolución temprana de las plantas vasculares por su posición en la filogenia de las plantas terrestres (**Figura 3.6**). Es de interés señalar que *S. moellendorffii* fue la primera planta vascular no formadora de semilla cuyo genoma fue secuenciado (Banks *et al.* 2011).

Como se mencionó anteriormente, *S. lepidophylla* es una de las plantas de resurrección más estudiadas aunque existen al menos otras 12 especies de *Selaginella* reportadas como TD

(Proctor y Pence, 2002). El trabajo más relevante en cuanto a expresión génica como respuesta a la deshidratación que se tiene hasta la fecha es el de Iturriaga *et al.* (2006), quienes utilizaron EST (“Expressed Sequence Tags”). En este estudio compararon con una base de datos de *S. moellendorffii* (especie intolerante) identificando EST para transporte, estructura celular, chaperonas y proteínas LEA como asociados a la TD en *S. lepidophylla* (Dinakar y Bartels, 2013). Aunque es importante mencionar que las librerías de EST comparadas son de condiciones totalmente distintas, ya que en el caso de *S. lepidophylla* fueron construidas a las 2.5 h de iniciado un tratamiento de deshidratación mientras que para las librerías de *S. moellendorffii* se utilizó una mezcla de tejidos de plantas en condiciones de crecimiento óptimas. En la **Figura 3.7** se muestra la categorización funcional de los EST.

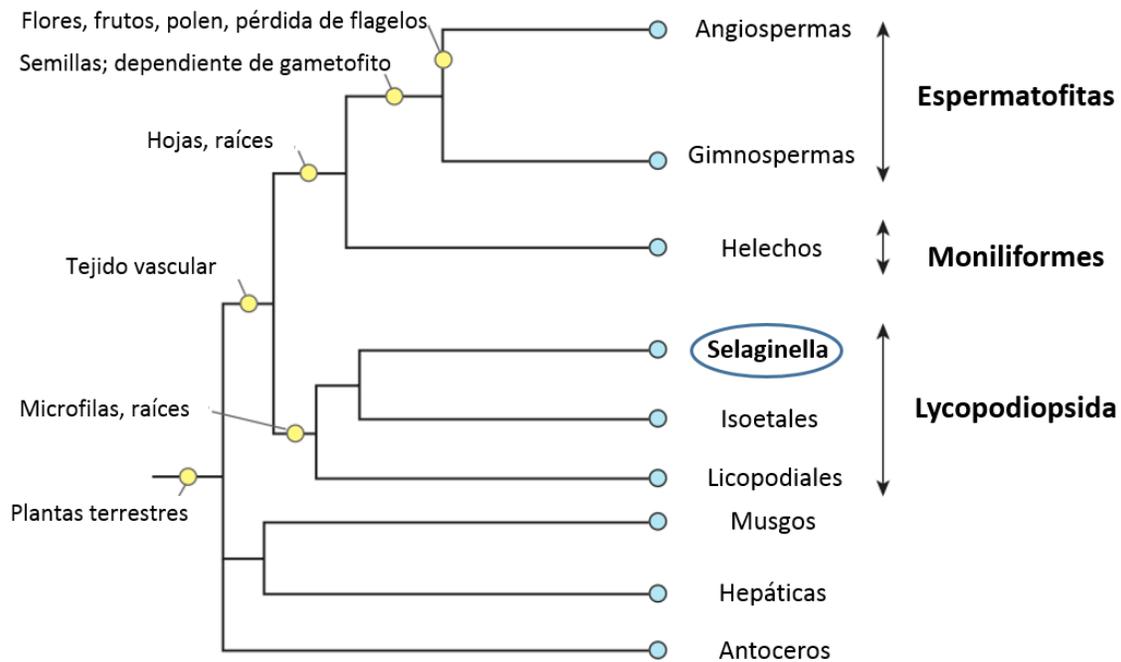


FIGURA 3.6 Relaciones filogenéticas de plantas terrestres y características asociadas con su evolución. Modificada de Banks (2009).

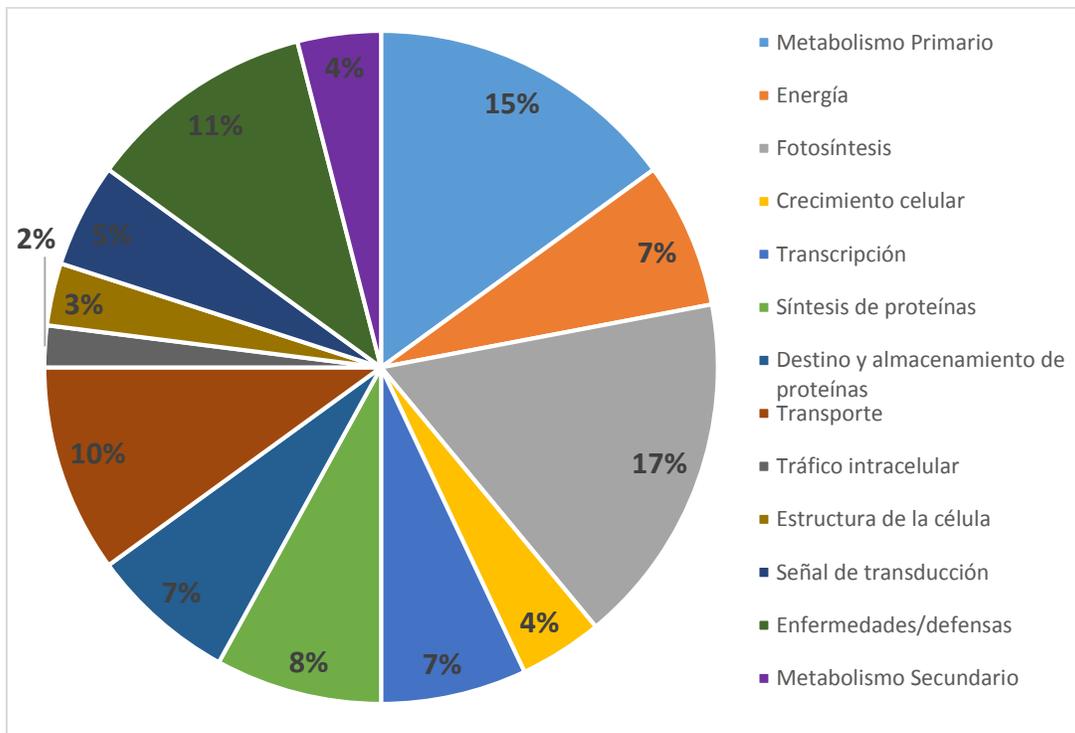


FIGURA 3.7 Categorización funcional de los EST de *S. lepidophylla*. Las librerías de EST fueron generadas a partir de plantas que sufrieron un tratamiento de deshidratación de 2.5 h. Extraída de Iturriaga *et al.* (2006).

IV. JUSTIFICACIÓN

En la naturaleza existen organismos que no sólo toleran la sequía, sino que pueden deshidratarse hasta extremos que son letales para la mayoría de los organismos. Un grupo de ellos está constituido por las plantas conocidas como de resurrección, que reciben su nombre por su capacidad de regresar a la vida después de aparentar estar muertas. El estudio de este tipo de organismos permitirá el desarrollo de nuevos sistemas que puedan contribuir a la generación de cultivos tolerantes a la sequía.

Todas las plantas complejas poseen un tejido o en algún punto de su ciclo de vida tienen la capacidad de tolerar la sequía extrema. Además de que varios estudios han mostrado que los mecanismos empleados por las plantas de resurrección para sobrevivir a la pérdida de agua son mecanismos con los que también cuentan las plantas sensibles al estrés hídrico. Por lo que el potencial para desarrollar tolerancia puede residir en la misma planta.

Nosotros creemos que las plantas sensibles a la sequía tienen la maquinaria (es decir, los genes) necesaria para conferir la tolerancia. Sin embargo, la regulación de dicha maquinaria no es tan fina como en las plantas de resurrección.

Los resultados de este trabajo aportarán información acerca de las diferencias entre plantas tolerantes e intolerantes de especies filogenéticamente cercanas para identificar los procesos, mecanismos o miembros específicos de familias de genes que son importantes para la adquisición de la tolerancia a la desecación.

V. OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Hacer un estudio comparativo del transcriptoma de especies filogenéticamente relacionadas que sean tolerantes o intolerantes a la desecación para determinar si la cinética o niveles de expresión de los genes de la respuesta a la pérdida de agua son diferenciales.

- **Objetivos particulares:**

1. Identificar un grupo de plantas o especies filogenéticamente cercanas que difieran en la tolerancia a la desecación
2. Establecer puntos críticos de la pérdida de agua para el análisis de tolerancia a la desecación.
3. Determinar el repertorio de transcritos de las especies tolerantes e intolerantes en diferentes estadios del proceso de desecación y rehidratación.
4. Determinar genes diferencialmente expresados entre especies tolerantes e intolerantes a la desecación en diferentes etapas, durante la deshidratación y la rehidratación.
5. Identificar procesos potencialmente involucrados con la tolerancia a la desecación entre plantas que difieran en esta característica.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención de material

El material se obtuvo mediante solicitud de especímenes a colecciones de jardines botánicos (*S. denticulata* del Instituto de Biología de la UNAM), donación de material por parte de compañeros de trabajo (*S. lepidophylla* de la localidad de Tlacotepec en el estado de Morelos), y el resto del material se obtuvo a partir de colectas en campo. En la sección de **Anexos** se incluye un mapa con todos los sitios de colecta y fotografías de las plantas colectadas en su hábitat natural (**Figuras A1** y **A2**, respectivamente).

6.2 Determinación de la tolerancia a la desecación

De cada una de los especímenes se colectaron frondas (**Figura A3**, en **Anexos**) en buen estado y se colocaron en cajas Petri; se dejaron secar por 24 h, y posteriormente fueron rehidratadas con agua destilada por un periodo de 12 h. En cada una de estas etapas se fotografió el tejido. Después de este proceso se determinó si el tejido seguía viable en base a la coloración de las frondas (p. ej., si conservaba la coloración verde que tenían antes del proceso de secado) o si presentaba oxidación (p. ej. tejido café oscuro o en necrosis). Este proceso de deshidratación-rehidratación se repitió varias veces para determinar la tolerancia de un espécimen. Cuando el tejido seguía viable después de varios de estos ciclos, se consideró como un organismo tolerante a la pérdida de agua.

6.3 Cinéticas de pérdida de agua

Se colectaron frondas de diferentes especies procurando tomar tejido en buen estado, se removió todo el tejido no viable (tejido dañado o con partes secas), y se realizaron lavados con agua destilada estéril. La imbibición se llevó a cabo sumergiendo el tejido en agua destilada estéril por 30 min. Pasado este tiempo se retiró el excedente de agua y se colocó en cajas Petri dentro de una cámara de crecimiento a 24°C. Las placas fueron removidas a intervalos de tiempo específicos para ser pesadas y calcular el contenido de agua del tejido.

6.4 Cinéticas y colecta de tejido para extracción de RNA

En el caso de las muestras para el transcriptoma las plantas fueron acondicionadas al menos 3 días antes de las cinéticas de pérdida de agua. Se colocaron en una cámara de crecimiento

(Percival) a 25°C en un ciclo de 16 h luz y 8 h oscuridad, con una intensidad luminosa de aproximadamente 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Se colectaron frondas (**Figura A3**, en **Anexos**) de una población de al menos 15 individuos en el caso de especies con morfología de roseta, o de varios ápices para las especies postradas, realizando dos réplicas biológicas por cada especie. Se removió todo el tejido no viable, y se limpió con agua destilada estéril. Posteriormente se embebió en agua destilada estéril por 1 h para llevar el tejido a un mismo contenido de agua. Después se secó el tejido con toallas de papel y se colocó en cajas Petri (d 8.8 x 2.5 cm) por 30 min para permitir una adaptación / recuperación. Por último se colocaron las cajas Petri destapadas dentro de un contenedor de plástico (40 x 21.5 x 13 cm aproximadamente) que contenía recipientes desechables (Reyma 0.5 l) con una solución sobresaturada de MgCl_2 (relación 40:13, 40 g de MgCl_2 por cada 13 ml de agua) para mantener la humedad del sistema, el cual estaba sellado en su parte superior con un cristal (intensidad luminosa dentro de los contenedores de 85 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, aproximadamente). Dicho sistema estaba dentro de la misma cámara de crecimiento donde se tenían las plantas. Las placas se removieron a intervalos de tiempo constantes para ser pesadas y así determinar la pérdida de agua con respecto al peso seco.

6.5 Determinación del contenido de agua

Para llevar las muestras a peso seco (PS) se colocaron en horno a 80°C por un mínimo de 15 horas. El peso inicial (PI) corresponde al peso después de embeber el tejido en agua destilada por 30 min y fue considerado como el 100% de contenido de agua. La determinación del contenido de agua a los tiempos de interés (Pt_x) se realizó con la siguiente formula:

$$\text{Cont. de Agua (\%)} = \left(\frac{Pt_x - PS}{PI - PS} \right) * 100$$

6.6 Lecturas de actividad fotosintética

Éstas se realizaron con el equipo LI-6400XT (LI-COR) adaptado a una cámara para briófitas (Bryophyte Chamber) con los siguientes parámetros:

Temperatura = 22°C

Flujo de CO_2 = 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Flujo Aire = 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$

Intensidad luminosa = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Las plantas se mantuvieron en cuarto de crecimiento a 22°C. Las lecturas de fotosíntesis se realizaron a intervalos de tiempo específicos en frondas previamente embebidas en agua

destilada (30 min) que se dejaron deshidratar manteniéndolas en cajas Petri abiertas a $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa aproximadamente durante toda la toma de lecturas. La posterior rehidratación se realizó con agua destilada manteniendo las muestras en un ambiente saturado.

6.7 Extracción de RNA

El tejido fue molido en nitrógeno líquido hasta polvo fino. Posteriormente las muestras fueron extraídas con el reactivo PureLink® Plant RNA Reagent (especial para tejidos ricos en polifenoles o en almidón) acorde a las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). Debido a las bajas relaciones de pureza obtenidas se determinó tratar las muestras con TRIzol® como procedimiento de limpieza siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). En caso de que las muestras siguieran presentando bajas relaciones de pureza se precipitó el RNA con acetato de sodio 3M y se realizaron lavados con etanol al 75%.

6.8 Secuenciación

Anterior a la secuenciación, se verificó la integridad de los RNAs con el equipo 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies). En base a su valor de RIN (“RNA Integrity Number”) se determinó cuales muestras eran adecuadas para la elaboración de librerías.

Las librerías se generaron utilizando TruSeq RNA Library Preparation Kit v2 (Illumina) y la secuenciación se realizó con la plataforma NextSeq (Illumina) con el formato Pair-End (2 x 75), obteniéndose un total de 610 972 633 lecturas.

6.9 Procesamiento de lecturas crudas y ensamblado

El procesamiento se realizó con el software Trimmomatic (versión 0.35) para retirar secuencias de baja calidad y las secuencias de los adaptadores que se utilizaron en la secuenciación. También se utilizó el programa FastQC (versión v0.11.5) para determinar el contenido de GC y la calidad de las secuencias.

El ensamblado se realizó con Trinity (versión v2.1.1) con todos los parámetros por defecto, haciendo el ensamblado del conjunto de librerías de cada una de las especies.

6.10 Anotación funcional

La anotación de los transcriptomas se hizo acorde a búsquedas de homologías (Blastx) de las secuencias producto de los ensamblados contra las siguientes bases de datos y organismos:

TABLA 6.1 Bases de datos empleadas en la anotación.

Base de Datos	Descripción	Fuente
UniProt SwissProt	Manualmente anotada, contiene evidencia experimental	https://data.broadinstitute.org/Trinity/Trinotate_v2.0_RESOURCES/uniprot_sprot.trinotate_v2.0.pep.gz
RefSeq	No redundante, solo secuencias de plantas	ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/plant/
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Modelos proteicos en genoma	http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Modelos proteicos en genoma	http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html
<i>Physcomitrella patens</i>	Modelos proteicos en genoma	http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html
<i>Amborella trichopoda</i>	Modelos proteicos en genoma	http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html

La búsqueda de dominios de proteínas se realizó con la herramienta HMMER (versión v3.1b2) en marcos de lectura (u ORF, por sus siglas en inglés) obtenidos con TransDecoder (versión v2.0.1) en la base de datos Pfam (https://data.broadinstitute.org/Trinity/Trinotate_v2.0_RESOURCES/Pfam-A.hmm.gz).

Los términos GO correspondientes a los dominios de proteínas y de los resultados contra UniProt SwissProt fueron extraídos de un reporte generado en Trinotate (versión v2.0.2), además de la adición de los términos GO correspondientes a los resultados significativos contra *Arabidopsis* (TAIR).

Todo lo anterior se realizó ingresando y manipulando los resultados en el sistema MySQL para poder generar una base de datos con las secuencias y sus respectivos resultados de cada uno de los campos antes mencionados. Además de incluir información relevante de la secuencia blanco en el caso de los Blast, como el organismo fuente, descripción / función, porcentaje de identidad, longitud del alineamiento, E-value y Bitscore. Para la elaboración de diagramas de Venn se empleó la herramienta en línea Jvenn (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/>).

6.11 Análisis de expresión diferencial

La cuantificación de transcritos se hizo mediante un script del paquete Trinity que utiliza bowtie2 como método de alineamiento y RSEM como método de estimación. Los genes diferencialmente expresados se obtuvieron con el paquete edgeR proporcionando un valor de dispersión determinado con TransInfo (Garcias-Ortega, L. F y Martínez, O., comunicación personal). Los genes fueron seleccionados como diferencialmente expresados en base a una tasa de cambio ($\logFC \geq 2$ o $\logFC \leq -2$) y si estos eran estadísticamente significativos (FDR ≤ 0.01 ; “False Discovery Rate”) dentro de MySQL. Para la elaboración de diagramas de Venn se empleó la herramienta en línea Jvenn (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/>).

6.12 Enriquecimientos funcionales

Se seleccionó la herramienta en línea Functional Classification SuperViewer (http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi) empleando los identificadores de los genes diferencialmente expresados que tenían anotación con *A. thaliana* y como fuente para la clasificación se seleccionó MapMan. Se consideraron como significativas aquellas categorías con un P-value < 0.05

VII. RESULTADOS

7.1 Identificación del grupo de estudio y obtención del material

En base a los estudios de Proctor y Pence (2002), Bartels y Hussain (2011), además de otras fuentes como Iturriaga *et al.* (2000) se recopiló información de todas las plantas vasculares reportadas como tolerantes a la desecación (más de 300 especies). En la **Tabla 7.1** se muestran especies TD identificadas en México.

TABLA 7.1 Plantas de resurrección reportadas en México.

Especie	Familia	No. de especies del género reportadas por la CONABIO	Referencia
<i>Selaginella lepidophylla</i> ; <i>S. sartorii</i>	PTERIDOPHYTES; <i>LYCOPSIDA</i> ; <i>Selaginellaceae</i>	83	Proctor y Pence (2002); Iturriaga et al. (2000)
<i>Cheilanthes bonariensis</i> , <i>C. integerrima</i> , <i>C. myriophylla</i> , <i>C. wrightii</i>	PTERIDOPHYTES; <i>PTEROPSIDA</i> ; <i>Pteridaceae</i>	62	Proctor y Pence (2002); Iturriaga et al. (2000)
<i>Pellaea atropurpurea</i> , <i>P. longimucronata</i> , <i>P. sagittata</i>	PTERIDOPHYTES; <i>PTEROPSIDA</i> ; <i>Pteridaceae</i>	16	Proctor y Pence (2002); Iturriaga et al. (2000)
<i>Microchloa indica</i>	ANGIOSPERMS; MONOCOTYLEDONS; <i>Poaceae</i>	2	Proctor y Pence (2002); Iturriaga et al. (2000)
<i>Sporobolus atrovirens</i>	ANGIOSPERMS; MONOCOTYLEDONS; <i>Poaceae</i>	29	Proctor y Pence (2002); Iturriaga et al. (2000)
<i>Tripogon spicatus</i>	ANGIOSPERMS; MONOCOTYLEDONS; <i>Poaceae</i>	1	Proctor y Pence (2002); Iturriaga et al. (2000)

Revisando el Catálogo Taxonómico de Especies de México (CONABIO, 2008), se encontró que el territorio nacional posee una gran riqueza en el género *Selaginella* como se observa en la **Tabla 7.2**.

Basados en la información del catálogo de la CONABIO (2008), que cuenta con la distribución por estados de la república de la mayoría de las especies de *Selaginella* reportadas en México, se contabilizó el número de especies por estado, como se muestra en la **Figura 7.1**.

TABLA 7.2 Especies del género *Selaginella* que han sido identificadas en México.

1	<i>S. acutifolia</i>	30	<i>S. gypsophila</i>	58	<i>S. polyptera</i>
2	<i>S. apoda</i>	31	<i>S. harrisii</i>	59	<i>S. popayanensis</i>
3	<i>S. arizonica</i>	32	<i>S. hirtifolia</i>	60	<i>S. porphyrospora</i>
4	<i>S. arsenei</i>	33	<i>S. hoffmannii</i>	61	<i>S. prolifera</i>
5	<i>S. arsiclada</i>	34	<i>S. huehuetenangensis</i>	62	<i>S. pulcherrima</i>
6	<i>S. asprella</i>	35	<i>S. illecebrosa</i>	63	<i>S. reflexa</i>
7	<i>S. barnebyana</i>	36	<i>S. landii</i>	64	<i>S. ribae</i>
8	<i>S. basipilosa</i>	37	<i>S. lepidophylla</i> ¹	65	<i>S. rupestris</i>
9	<i>S. bernoullii</i>	38	<i>S. lindenii</i>	66	<i>S. rupicola</i>
10	<i>S. bigelovii</i>	39	<i>S. lineolata</i>	67	<i>S. rzedowskii</i>
11	<i>S. breedlovei</i>	40	<i>S. macrathera</i>	68	<i>S. sartorii</i> ¹
12	<i>S. carioi</i>	41	<i>S. marginata</i>	69	<i>S. schaffneri</i>
13	<i>S. carnerosana</i>	42	<i>S. martensii</i>	70	<i>S. schiedeana</i>
14	<i>S. chiapensis</i>	43	<i>S. mickelii</i>	71	<i>S. schizobasis</i>
15	<i>S. cinerascens</i>	44	<i>S. minima</i>	72	<i>S. sellowii</i> ¹
16	<i>S. cladorrhizans</i>	45	<i>S. mixteca</i>	73	<i>S. sertata</i>
17	<i>S. convolute</i> ¹	46	<i>S. mollis</i> *	74	<i>S. silvestris</i>
18	<i>S. corrugis</i>	47	<i>S. moritziana</i>	75	<i>S. simplex</i>
19	<i>S. cuneata</i>	48	<i>S. mosorongensis</i>	76	<i>S. stellata</i>
20	<i>S. cuspidata</i>	49	<i>S. mutica</i>	77	<i>S. stenophylla</i>
21	<i>S. delicatissima</i>	50	<i>S. nothohybrida</i>	78	<i>S. steyermarkii</i>
22	<i>S. eremophila</i>	51	<i>S. novoleonensis</i>	79	<i>S. subrugosa</i>
23	<i>S. eurynota</i>	52	<i>S. oaxacana</i>	80	<i>S. tarda</i>
24	<i>S. extensa</i>	53	<i>S. orizabensis</i>	81	<i>S. tenella</i>
25	<i>S. finitima</i>	54	<i>S. pallescens</i>	82	<i>S. tuberosa</i>
26	<i>S. flagellata</i>	55	<i>S. parishii</i>	83	<i>S. underwoodii</i>
27	<i>S. flexuosa</i>	56	<i>S. peruviana</i> ¹	84	<i>S. viridissima</i>
28	<i>S. galeottii</i> *	57	<i>S. pilifera</i> ¹	85	<i>S. wrightii</i>
29	<i>S. guatemalensis</i>				

¹ Las especies en letras rojas corresponden a especies reportadas como tolerantes a la desecación.

Aquellas marcadas () fueron adicionadas de información de la base de datos del Herbario Nacional de México (MEXU; <http://www.ib.unam.mx/botanica/herbario/>).

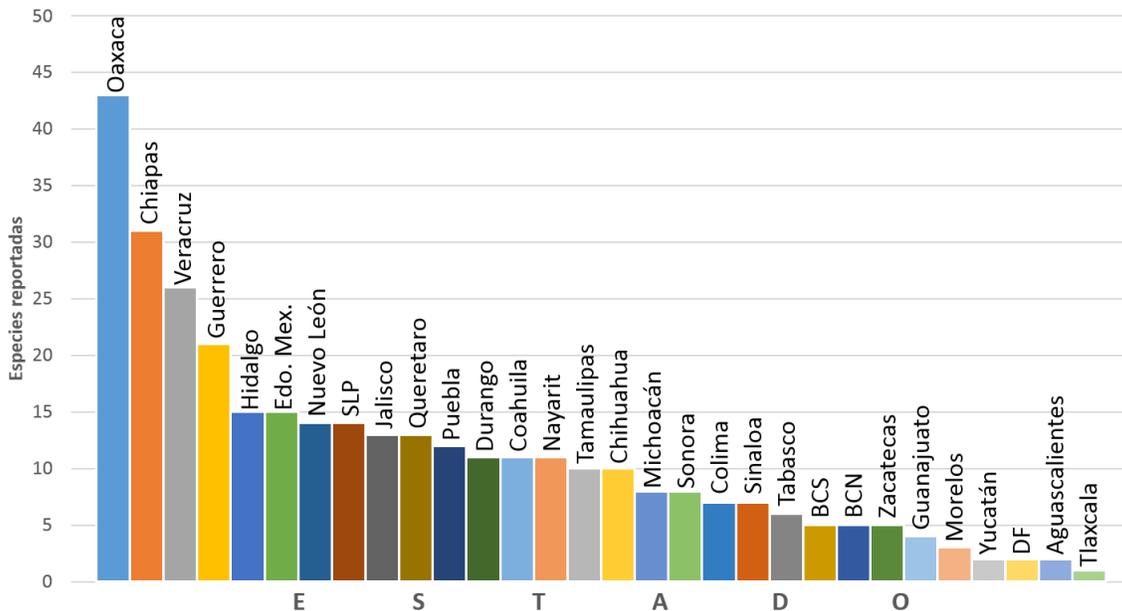


FIGURA 7.1 Distribución de especies de *Selaginella* por estados. Información extraída de la CONABIO (2008)

Debido al poco interés que se le ha dado a este grupo de plantas, las colecciones botánicas que mantienen un registro de sus especímenes cuentan con pocos ejemplares del género *Selaginella* y en la mayoría de los casos, muchos de ellos ni siquiera están identificadas. Por lo que la mayoría de las especies analizadas se obtuvo mediante colectas en campo en base a criterios como la precipitación por estados y número de especies distintas del género *Selaginella* en dicha entidad. Consultando datos del Servicio Meteorológico Nacional sobre los niveles de precipitación de los últimos 5 años en las entidades federativas, se encontró lo mostrado en la **Tabla 7.3**.

Los estados elegidos para las colectas fueron Oaxaca y Veracruz por sus altos niveles de precipitación y un número considerable de especies reportadas (43 y 26 especies reportadas, respectivamente), y Durango por ser el estado con mayor número de especies reportadas (11 especies reportadas) entre aquellos con bajos niveles de precipitación. Se visitaron, además, las zonas aledañas y se colectó en el trayecto a los sitios de interés. En la sección de **Anexos** se incluye un mapa con todos los sitios de colecta, así como fotografías de las plantas en su

hábitat natural (**Figura A2**). En total se colectaron 22 especímenes, los cuales se incluyen en la **Tabla 7.4**.

TABLA 7.3 Precipitación anual por estados en los últimos 5 años.

Estados con los menores niveles de precipitación*					
Lugar	2010	2011	2012	2013	2014
1	Baja California Sur (109.3 mm)	Baja California Sur (69.4 mm)	Baja California (150.3 mm)	Baja California (193.8 mm)	Baja California (85.1 mm)
2	Baja California (297.4 mm)	Coahuila (176 mm)	Baja California Sur (305.9 mm)	Baja California Sur (229 mm)	Baja California Sur (334.7 mm)
3	Sonora (453 mm)	Baja California (206.8 mm)	Coahuila (323.6 mm)	Coahuila (443.6 mm)	Coahuila (423.8 mm)
4	Chihuahua (470 mm)	Durango (245.6 mm)	Sonora (382.1 mm)	Sonora (446.7 mm)	Sonora (480.5 mm)
5	Aguascalientes (493.1 mm)	Aguascalientes (257.8 mm)	Durango (406.3 mm)	Durango (516.8 mm)	Chihuahua (490 mm)
Estados con los mayores niveles de precipitación*					
Lugar	2010	2011	2012	2013	2014
1	Chiapas (2730.3 mm)	Tabasco (2496.5 mm)	Tabasco (2069.7 mm)	Tabasco (2811.9 mm)	Tabasco (2394.4 mm)
2	Tabasco (2561.9 mm)	Chiapas (2381.6 mm)	Chiapas (1885.3 mm)	Chiapas (2278.6 mm)	Chiapas (2056.1 mm)
3	Oaxaca (1940.1 mm)	Veracruz (1553.5 mm)	Veracruz (1695.9 mm)	Quintana Roo (1898.5 mm)	Colima (1920.4 mm)
4	Veracruz (1791.1 mm)	Quintana Roo (1476.3 mm)	Puebla (1390.5 mm)	Colima (1877.1 mm)	Morelos (1777.8 mm)
5	Nayarit (1649.8 mm)	Oaxaca (1388.6 mm)	Oaxaca (1360 mm)	Veracruz (1852.4 mm)	Veracruz (1537.3 mm)

*La precipitación corresponde al promedio anual reportado por el Servicio Meteorológico Nacional (<http://smn1.conagua.gob.mx/>).

Cabe mencionar que las colectas realizadas en Veracruz, Puebla y Oaxaca se realizaron con la asesoría y apoyo del Dr. Klaus Mehlreter del Instituto de Ecología (INECOL). Posteriormente el Dr. Mehlreter nos apoyó con la identificación a nivel morfológico de las muestras que se obtuvieron en campo.

Además de las especies colectadas, se obtuvo material correspondiente a la especie *S. denticulata* (planta intolerante) del jardín botánico del Instituto de Biología de la UNAM gracias a la donación de material por parte de la M.C. Aída Téllez Velasco. Así también se agradece al Dr. Edgar Balcazar López por la donación de especímenes de *S. lepidophylla* de la localidad de Tlacotepec perteneciente al municipio de Zacualpan de Amilpas en el estado de Morelos.

TABLA 7.4 Ejemplares colectados en campo y material donado.

ID muestra	Especie	Morfología¹	TD²	Sitio de colecta
A-2504	<i>S. delicatissima</i>	P	No	Localidad de Ichaqueo, Morelia, Mich.
B-2504	<i>S. pallescens</i>	R	Indefinida	Localidad de Ichaqueo, Morelia, Mich.
1a1-1906	<i>S. sartorii</i>	P	Si	Carretera Durango-Cd. Canatlán (No. 45), Durango.
1a2-1906	<i>S. pallescens</i>	R	Indefinida	Carretera Durango-Cd. Canatlán (No. 45), Durango.
2a1-2006	<i>S. sartorii</i>	P	Si	Parque Nacional Sierra de Órganos, Sombrerete, Zacatecas.
2a2-2006	<i>S. pallescens</i>	R	Indefinida	Parque Nacional Sierra de Órganos, Sombrerete, Zacatecas.
3a1-2106	<i>S. lepidophylla</i>	R	Si	Jalpa, Zacatecas
4-1107	<i>S. delicatissima</i>	P	No	Carretera Xalapa – Coacoatzintla, Veracruz
5-1107	<i>S. pallescens</i>	R	No	Carretera Xalapa – Coacoatzintla, Veracruz
6-1107	<i>S. stellata</i>	E	No	Carretera Naolinco – Misantla, Veracruz
7-1107	<i>S. stellata</i>	E	No	Carretera Naolinco – Misantla, Veracruz
8-1307	<i>S. pallescens</i>	R	Indefinida	Carretera Xalapa – Puebla (Mazapiltepec), Puebla
9-1307	<i>Selaginella sp.</i>	P	Indefinida	Carretera Xalapa – Puebla (Mazapiltepec), Puebla
10-1307	<i>S. lepidophylla</i>	R	Si	Reserva de la Biosfera Tehuacán – Cuicatlán, Puebla
11-1407	<i>S. lepidophylla</i>	R	Si	Carretera Tehuacán – Teotitlán, Teotitlán, Oaxaca
12-1407	<i>S. extensa</i>	P	Si	Carretera Cuicatlán – Dominguillo, Dominguillo, Oaxaca
13-1407	<i>S. extensa</i>	P	Si	Carretera Cuicatlán – Dominguillo, Dominguillo, Oaxaca
14-1407	<i>S. basipilosa</i>	P	Indefinida	Carretera Dominguillo – San Juan Tonaltepec, Teotitlán, Oaxaca
15-1507	<i>S. pallescens</i>	R	Si	Carretera Oaxaca – Xalapa, Adequez, Oaxaca
16-1507	<i>S. basipilosa</i>	P	Indefinida	Carretera Oaxaca – Xalapa, Oaxaca
17-1607	<i>S. stellata</i>	E	No	Parque Francisco Javier Clavijero, Xalapa, Veracruz
18-1607	<i>S. martensii</i>	E	No	Parque Francisco Javier Clavijero, Xalapa, Veracruz
DONADO	<i>S. denticulata</i>	P	No	Jardín Botánico del IB-UNAM
DONADO	<i>S. lepidophylla</i>	R	Si	Localidad de Tlacotepec, Zacualpan de Amilpas, Mor.

¹Las morfologías se indican como Erecta (E), Postrada (P) y Roseta (R).

²La tolerancia a la desecación (TD) se determinó en base a los experimentos de deshidratación – rehidratación y las lecturas de fotosíntesis.

7.2 Ciclos de deshidratación – rehidratación

Uno de los ensayos para determinar si las plantas eran tolerantes o intolerantes a la desecación consistió en someter frondas de diferentes especies a ciclos de deshidratación – rehidratación. La **Tabla 7.4** enumera las muestras identificadas como tolerantes después de este experimento. La **Figura 7.2** muestra un ejemplo característico de este proceso. Cabe mencionar que algunas de estas muestras se llevaron hasta un 4to. ciclo de rehidratación (después de 255 días de que el tejido se cortó de la planta, y de 245 días de su última rehidratación), periodo después del que las plantas clasificadas como TD mantenían tejido con una coloración verde brillante aparentemente viable (**Figura A4**, en **Anexos**).

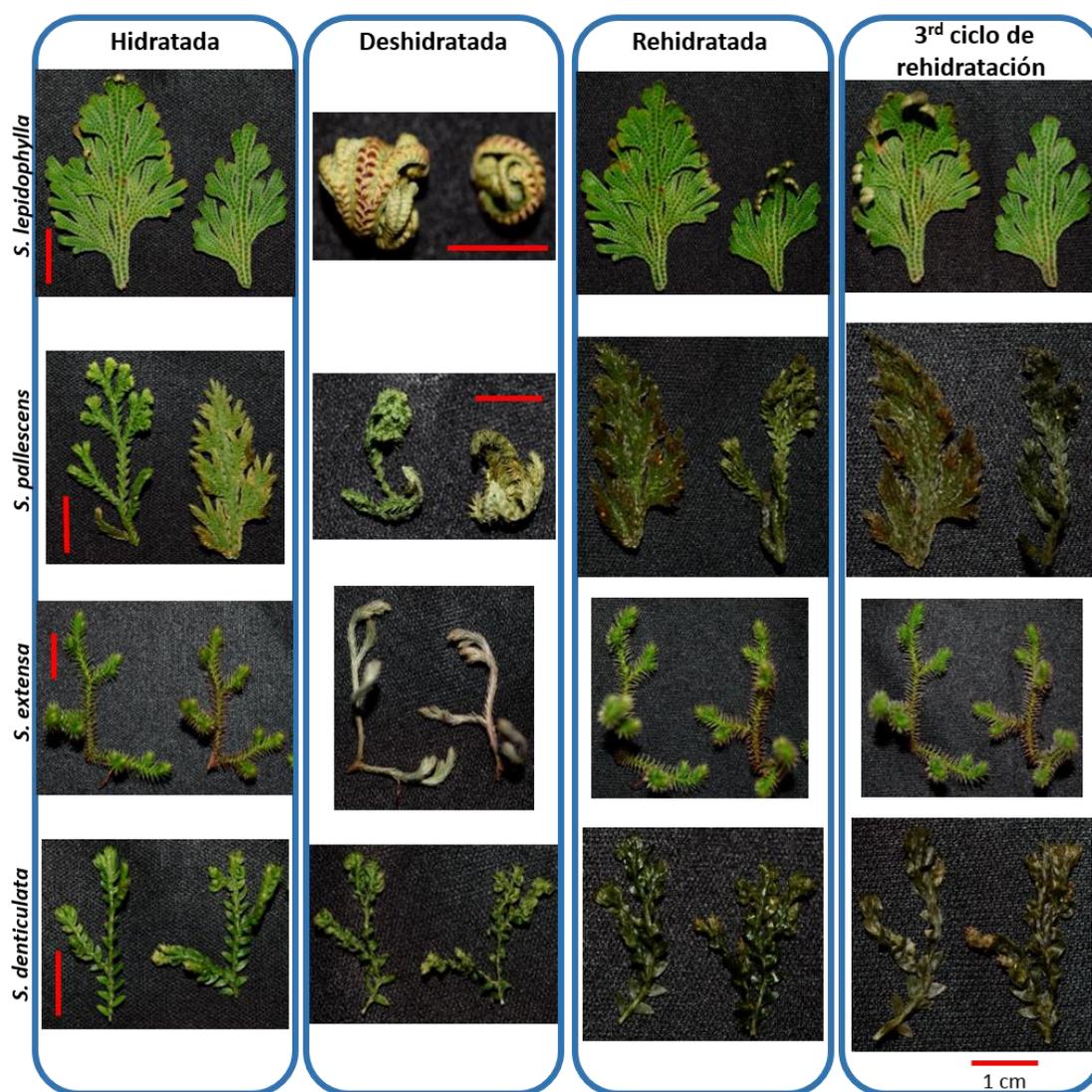


FIGURA 7.2 Ciclos de deshidratación – rehidratación en frondas de *Selaginella*. El tejido de la especie *S. lepidophylla* corresponde a la muestra 3a1-2106, el de *S. pallescens* a la muestra 5-1107 y el de *S. extensa* a 12-1407.

7.3 Cinéticas de pérdida de agua entre especies

Con el objetivo de comparar la pérdida de agua entre diferentes especies se colectaron frondas y se colocaron en cajas Petri después de haber sido embebidas, se dejaron secar y se determinó su contenido de agua a intervalos de tiempo específicos. La **Figura 7.3** muestra los resultados obtenidos para dos especies tolerantes y dos intolerantes a la desecación (en la **Figura A5** de la sección de **Anexos** se incluyen gráficos de todas las especies comparadas).

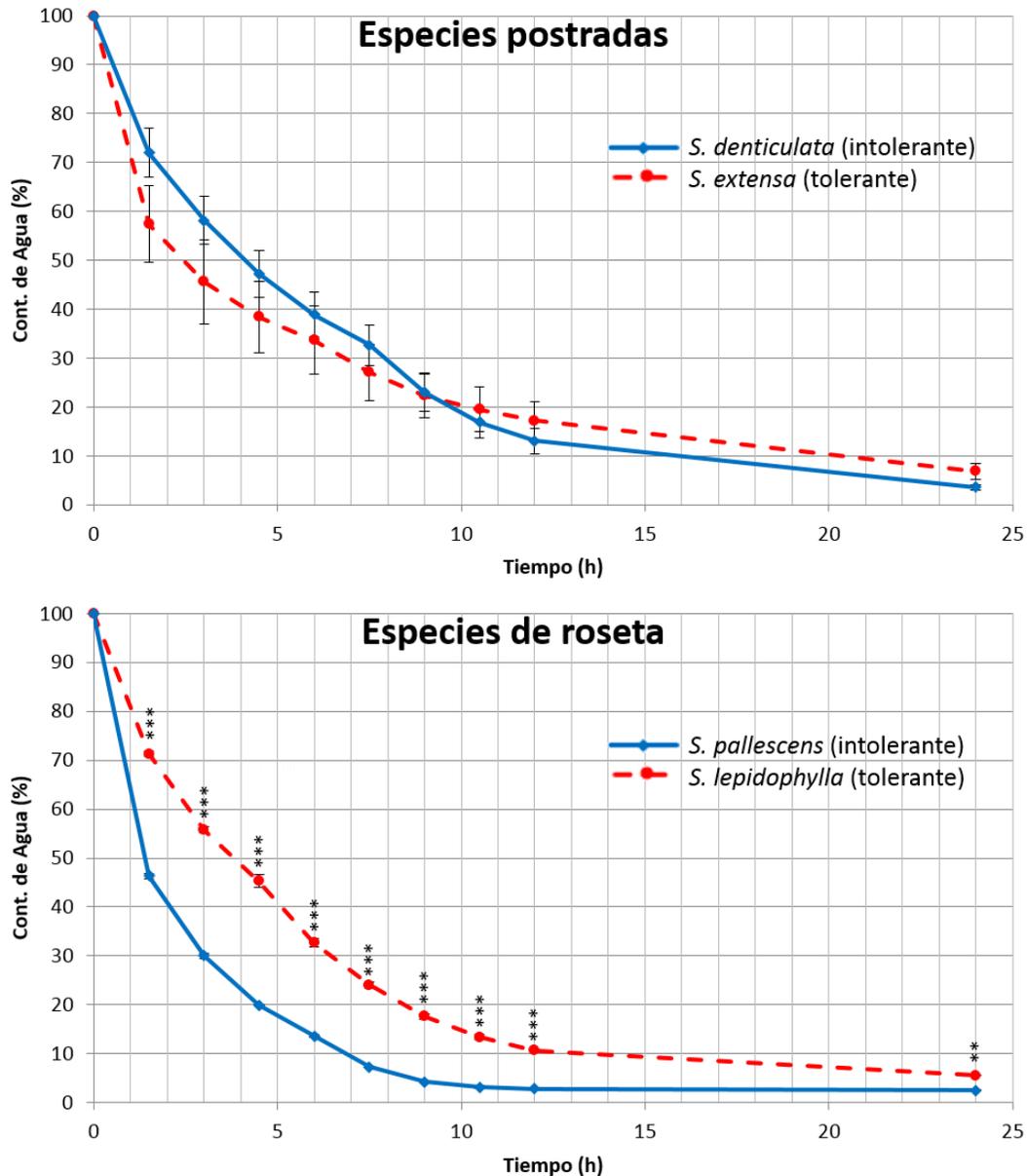


FIGURA 7.3 Pérdida de agua entre especies con morfología postrada y de roseta. Solamente la pérdida de agua entre especies con morfología de roseta fue estadísticamente significativa (T-test con un valor de $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**) o < 0.001 (***)).

La pérdida de agua solamente fue estadísticamente significativa entre especies con morfología de roseta que difieren en la tolerancia. Sin embargo, es necesario repetir estos experimentos e incluir más especies para determinar si existen comportamientos específicos entre especies tolerantes comparadas con las intolerantes.

7.4 Lecturas de fotosíntesis

Las lecturas de fotosíntesis se realizaron en el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se analizaron muestras de las especies: *S. denticulata*, *S. extensa*, *S. lepidophylla* y *S. pallescens*, con la finalidad de observar cambios en la tasa fotosintética durante la pérdida de agua y la posterior recuperación de la fotosíntesis durante la rehidratación (**Figura 7.4**).

Como se puede observar en la **Figura 7.4**, plantas como *S. lepidophylla* y *S. extensa* (ambas TD) reestablecen la fotosíntesis una vez que son rehidratadas. Sin embargo, los niveles observados no fueron los mismos a los valores observados en las frondas antes de la pérdida de agua. Lo anterior fue atribuido a que la toma de lectura se ve afectada por el exceso de agua en el tejido. En consecuencia, la fotosíntesis se calculó en base a la diferencia entre el flujo de CO₂ que entraba y salía de la cámara, como se muestra en la **Figura 7.5**. En esta figura, se observan niveles de consumo de CO₂ más cercanos a los determinados antes de la deshidratación una vez que la planta es rehidratada. Sin embargo, deben considerarse con cierta cautela, ya que no se tomó en cuenta el efecto que podría haber tenido la hora del día en la cual se realizó la toma de lecturas.

Con la finalidad de determinar un contenido de agua al cual puede haber una regulación en la fotosíntesis durante la pérdida de agua, se tomaron lecturas a intervalos de tiempo más cortos, como se muestra en la **Figura 7.6**.

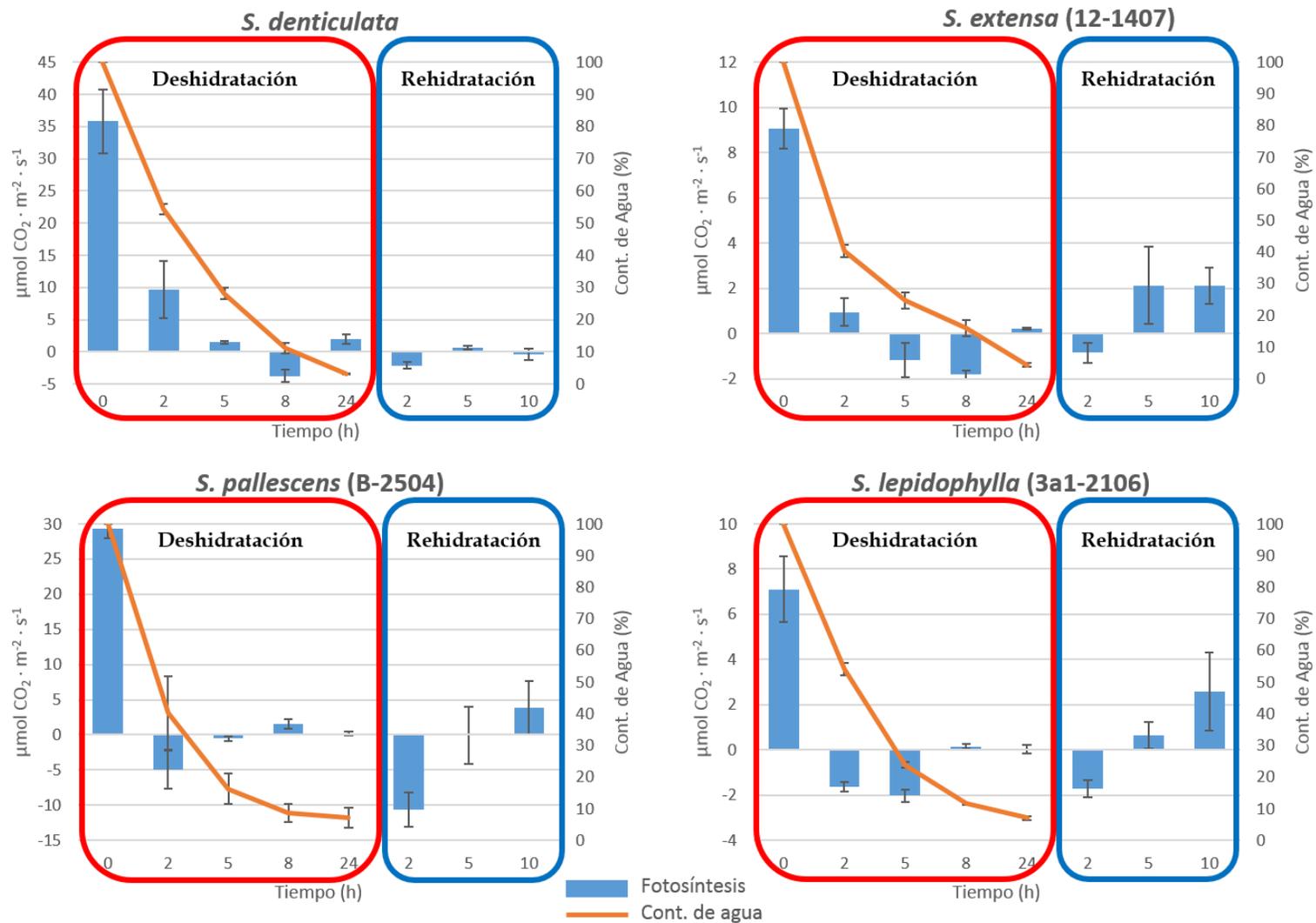


FIGURA 7.4 Actividad fotosintética durante la deshidratación y posterior rehidratación en frondas de diferentes especies de *Selaginella*. Entre paréntesis se indica el espécimen tomado como referencia.

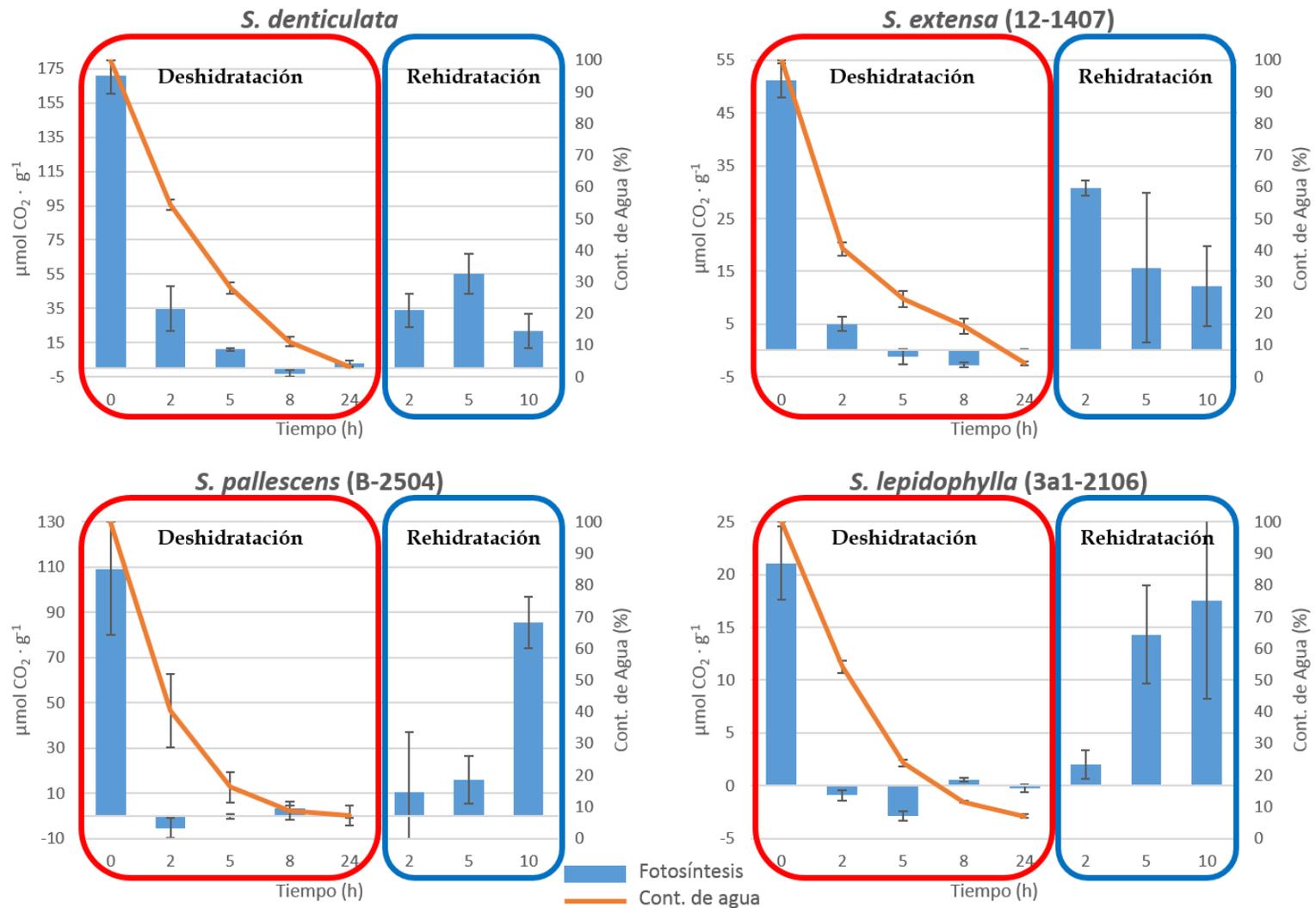


FIGURA 7.5 Actividad fotosintética ajustada a la absorción neta de CO_2 durante la deshidratación y posterior rehidratación en frondas de diferentes especies de *Selaginella*. Entre paréntesis se indica el espécimen tomado como referencia.

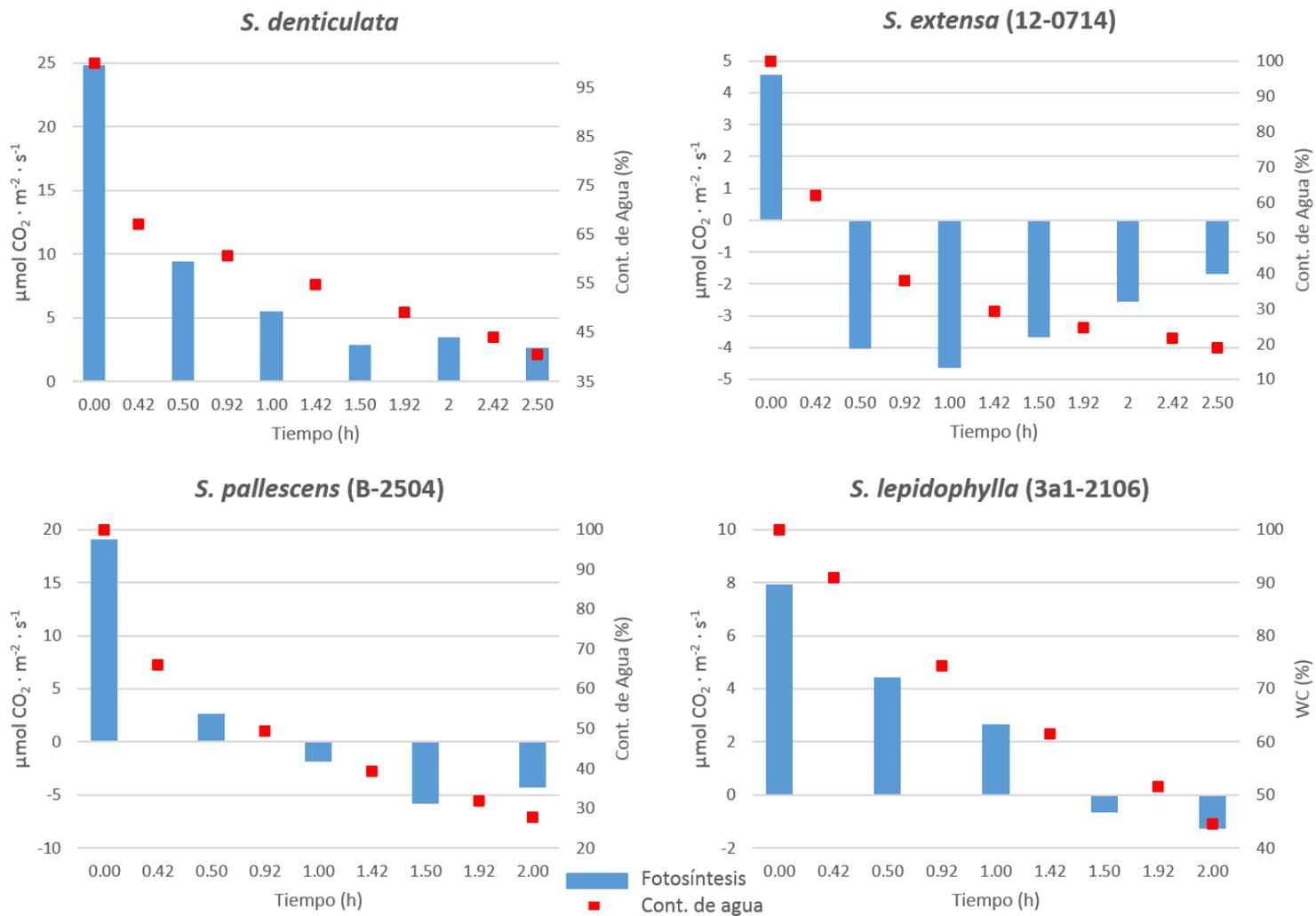


FIGURA 7.6 Actividad fotosintética asociada al contenido de agua en frondas de diferentes especies de *Selaginella*. Las lecturas de fotosíntesis (barras azules) y determinación de contenidos de agua (cuadros rojos) se realizaron a diferentes tiempos. Por esta razón se observan desfases. Los valores corresponden a un promedio de dos lecturas.

7.5 Cinéticas de pérdida de agua y toma de muestras para la realización de los transcriptomas

Tomando en cuenta que uno de los objetivos de este trabajo fue realizar comparaciones entre especies tolerantes e intolerantes a la desecación; se consideraron dos plantas tolerantes con diferente morfología (*S. lepidophylla* y *S. extensa*), una planta con tolerancia parcial o intermedia (*S. pallescens* 5-1107), y una planta intolerante (*S. denticulata*). Ya que la pérdida de agua ocurre a diferentes velocidades dependiendo de la especie (**Figura 7.3**), se decidió analizar la expresión de genes en ciertos contenidos de agua (100, 70, 50 y 10%) y durante la rehidratación (2 y 6 h después de agregar agua al tejido). La **Figura 7.7** muestra la estrategia experimental para la preparación de las muestras.

Las diferentes especies presentan una tendencia similar durante la pérdida de agua (**Figura 7.8**). También se registraron los cambios morfológicos durante la pérdida de agua y la rehidratación (**Figura 7.9**). Aunque las condiciones durante la pérdida de agua no fueron exactamente las mismas, refiriéndonos específicamente a la variación de la humedad en el sistema durante los experimentos, se observó una pérdida más rápida de agua en las frondas de las plantas intolerantes.

Se obtuvo una línea de tendencia de cada una de las cinéticas para determinar el tiempo correspondiente a la toma de tejido del cual se realizaría la extracción de RNA. Asimismo, teniendo en cuenta que la velocidad de la pérdida de agua está en función principalmente de la humedad y la temperatura en el ambiente, también se determinaron los porcentajes en pérdida con respecto al peso fresco inicial (**Figura A6**, en **Anexos**). Con esta medida se aseguró que las muestras se encontraban en el contenido de agua deseado, lo que dio mayor confiabilidad al proceso de muestreo.

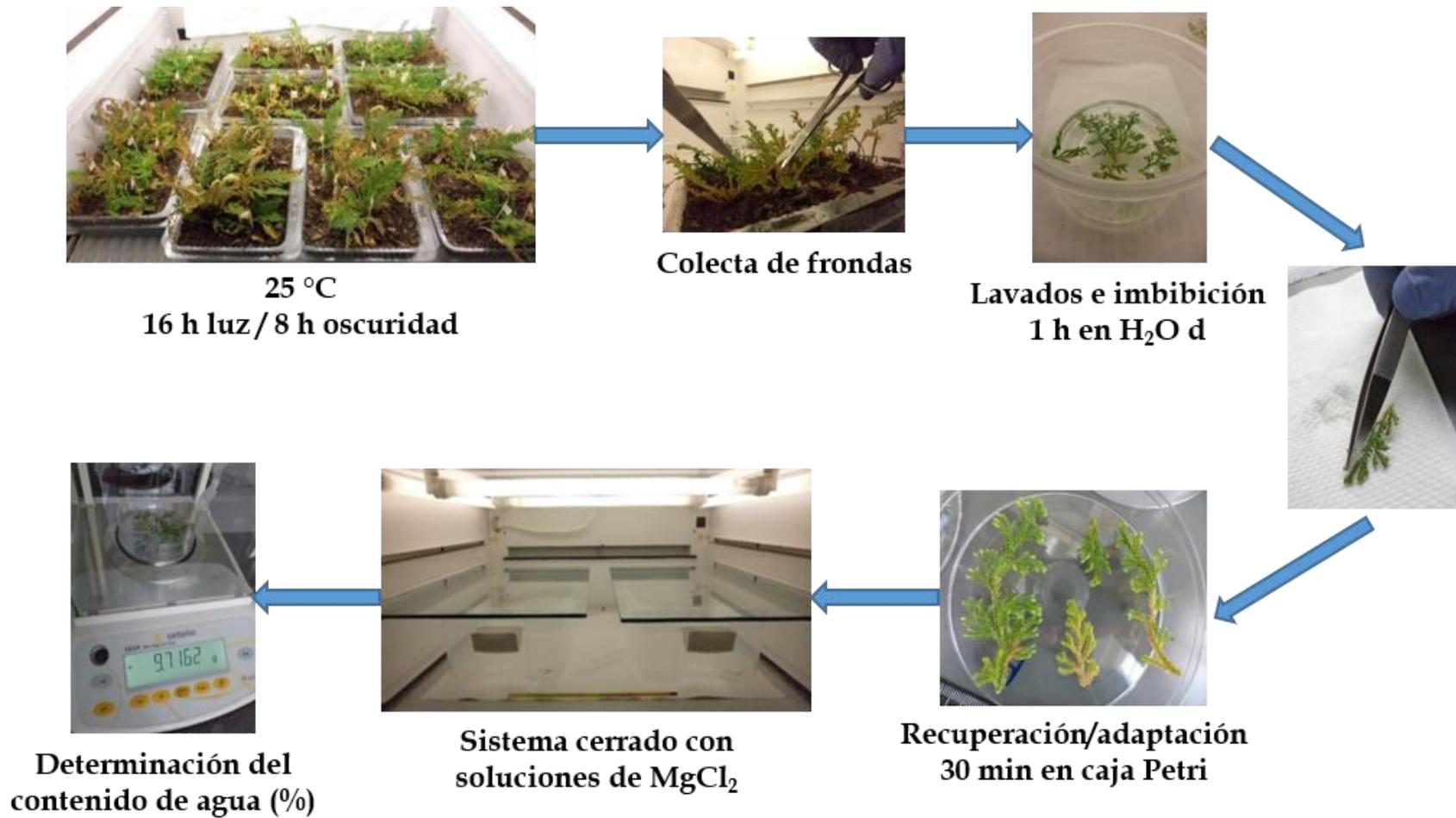


FIGURA 7.7 Diseño experimental de las cinéticas empleadas para toma de muestras usadas para la elaboración de los transcriptomas.

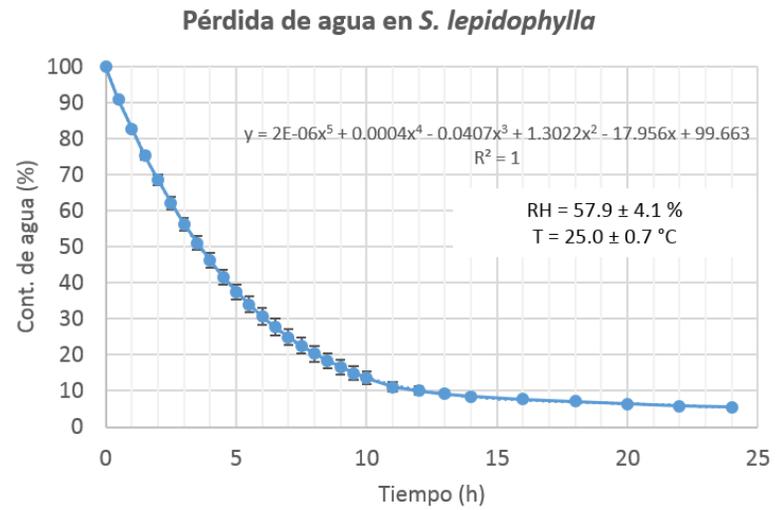
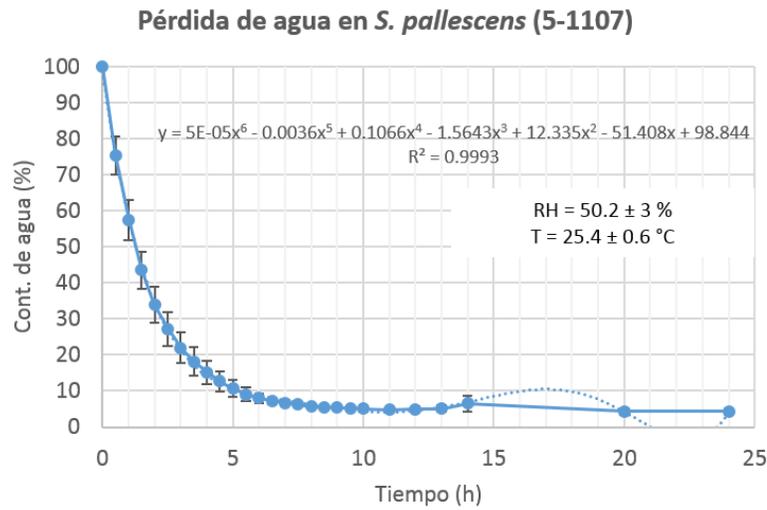
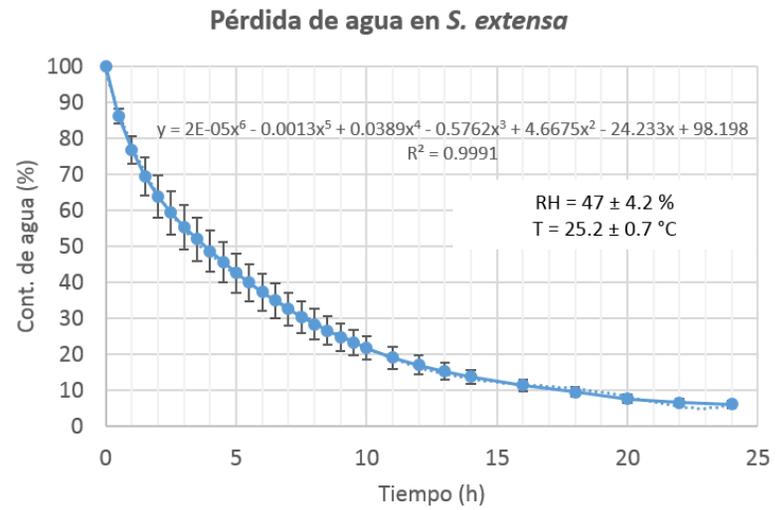
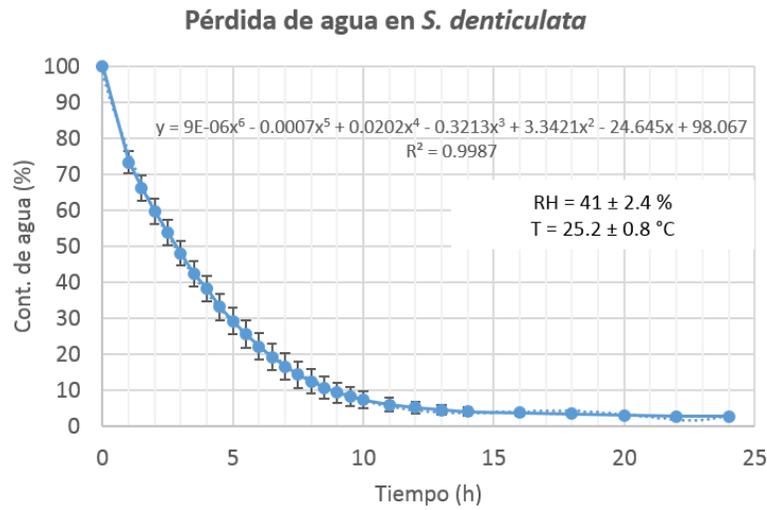


FIGURA 7.8 Cinéticas de pérdida de agua y líneas de tendencia en las cuatro especies empleadas para los transcriptomas. Entre paréntesis se indica el espécimen utilizado como referencia.



FIGURA 7.9 Cambios morfológicos experimentados durante la deshidratación y aspecto a las 2 h después de la rehidratación en las cuatro especies empleadas para los transcriptomas. En las imágenes puede asociarse el cambio en la morfología de las frondas con el contenido de agua (%).

7.6 Extracciones e integridad del RNA

Después de la extracción con el reactivo PureLink Plant RNA Reagent, la mayoría de las muestras de las diferentes especies presentaba una relación de pureza 260/230 baja, por lo que se optó por hacer limpieza empleando el método TRIzol, y en el caso de que las muestras siguieran presentando relaciones de pureza bajas se precipitaron y realizaron lavados con etanol. La **Figura 7.10** muestra los resultados de la extracción de la especie *S. lepidophylla* (similares a los obtenidos para *S. extensa* y *S. pallescens*). También se muestran los resultados de las muestras de *S. denticulata*. En lo que respecta a esta última especie, cabe mencionar que es intolerante a la pérdida de agua y por lo tanto, no fue sorpresivo observar la degradación del RNA una vez que el tejido fue rehidratado. Como la degradación del RNA es producto del daño que se produce durante la pérdida de agua y se observó durante la rehidratación, se tomó la decisión de realizar la secuenciación adicional de estas muestras.

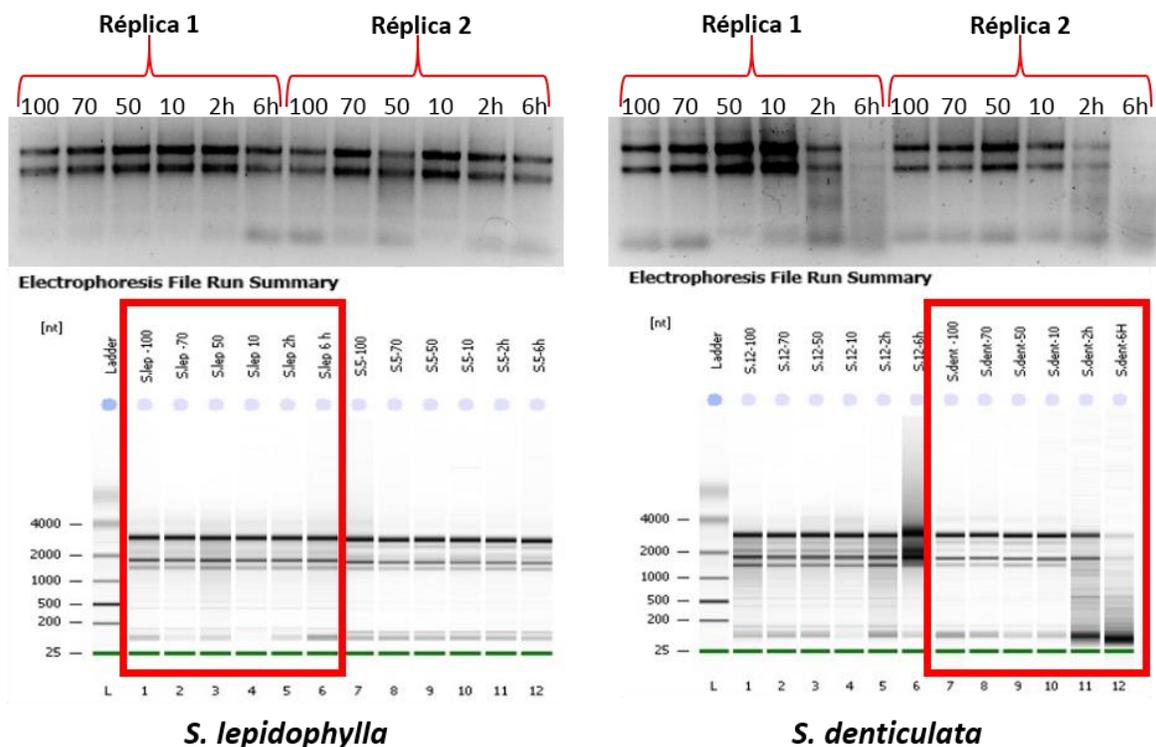


FIGURA 7.10 Aspecto de los RNA extraídos de especies contrastantes en la TD. Se muestra la integridad del RNA durante todo el proceso de deshidratación y rehidratación de una especie tolerante (*S. lepidophylla*) y la degradación del RNA en la rehidratación de una especie intolerante (*S. denticulata*). En la parte superior se muestran los geles de agarosa (1.2%) de las extracciones de RNA, mientras que en la parte inferior se tiene el electroferograma resultado del equipo Agilent 2100 Bioanalyzer System.

Para la elaboración de librerías y subsecuente secuenciación, se utilizaron mezclas equimolares utilizando las réplicas obtenidas en cada uno de los contenidos de agua o tiempos de rehidratación. La **Tabla 7.5** contiene los resultados de integridad de la cada una de estas mezclas:

TABLA 7.5 Valores de integridad (RIN) de los RNA de las muestras secuenciadas.

MUESTRA	RIN		MUESTRA	RIN
<i>S. denticulata</i>			<i>S. lepidophylla</i>	
100%	8.7		100%	8.0
70%	8.7		70%	8.2
50%	8.5		50%	7.4
10%	8.4		10%	8.3
2h	5.6*		2h	8.2
6h	2.9*		6h	7.9
<i>S. extensa</i>			<i>S. pallescens (5-1107)</i>	
100%	7.2		100%	8.2
70%	7.6		70%	8.8
50%	7.4		50%	8.8
10%	7.7		10%	8.6
2h	7.6		2h	8.3
6h	7.9		6h	8.4

*Se resaltan en rojo los valores de integridad de las muestras de una especie intolerante que presentaron degradación al ser rehidratadas.

El valor de integridad (RIN) varía dependiendo de la especie. En el caso de *Selaginella*, no existe un reporte que indique cuál es el valor mínimo de RIN para considerarlo adecuado para un análisis como RNAseq, mientras que en *A. thaliana* se considera que muestras con un RIN mayor a 7.2 tienen un valor de integridad adecuado (<http://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8850EN.pdf>, último acceso 4 de junio 2016). Tomando en cuenta este criterio, todas las muestras contaban con valores apropiados con excepción de las muestras de rehidratación de *S. denticulata* (RNA de una especie intolerante con evidente degradación durante la rehidratación; valores en rojo en la **Tabla 7.5**).

7.7 Resultados de la secuenciación y el preprocesamiento

La **Tabla 7.6** muestra el número de lecturas obtenidas para cada condición por especie. Teniendo un total de más de 120 millones de lecturas por especie, una cantidad suficiente para tener una amplia cobertura tratándose de genomas relativamente pequeños (de alrededor de 110 Mpb).

TABLA 7.6 Número de lecturas de cada librería antes y después de ser procesadas¹.

<i>S. denticulata</i>	Lecturas crudas	Procesadas	Conservadas (%)
100%	18876501	17206662	91.15
70%	31883700	29097840	91.26
50%	30374615	27825024	91.61
10%	33096587	30571218	92.37
2h	19617088	17978128	91.65
6h	14918303	13510351	90.56
TOTAL	148766794	136189223	
<i>S. extensa</i>	Lecturas crudas	Procesadas	Conservadas (%)
100%	18719236	16929905	90.44
70%	26196344	23895142	91.22
50%	20046801	18015967	89.87
10%	32615197	29981559	91.93
2h	20442006	18704679	91.50
6h	20268888	18428948	90.92
TOTAL	138288472	125956200	
<i>S. pallescens (5-1107)</i>	Lecturas crudas	Procesadas	Conservadas (%)
100%	22473687	20439545	90.95
70%	28163705	25791304	91.58
50%	16101574	14732309	91.50
10%	23557068	21376954	90.75
2h	13350964	11815899	88.50
6h	21011074	19081687	90.82
TOTAL	124658072	113237698	
<i>S. lepidophylla</i>	Lecturas crudas	Procesadas	Conservadas (%)
100%	50117943	46160216	92.10
70%	34211962	31462732	91.96
50%	26978733	24563112	91.05
10%	27099576	24852429	91.71
2h	22386942	20509124	91.61
6h	38464139	35240154	91.62
TOTAL	199259295	182787767	

¹La secuenciación se realizó en el formato Pair-End por lo que los valores mostrados corresponden a las lecturas en ambos sentidos.

Después de retirar secuencias de baja calidad y adaptadores con el software Trimmomatic, se conservó más del 90% de las lecturas por especie. Luego, se verificaron las calidades con el programa FastQC; en la **Figura 7.11** se incluye un ejemplo del resultado de este proceso.

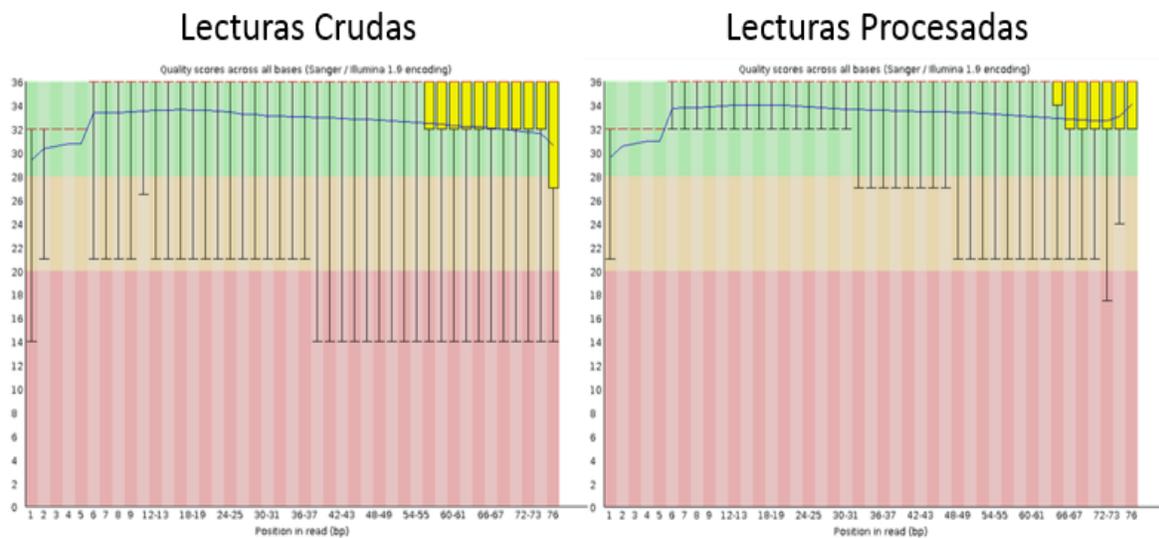


FIGURA 7.11 Resultado del procesamiento de lecturas de la muestra “2h” de *S. pallescens*. Se observan patrones similares en el tratamiento de las demás librerías. La región en verde indica secuencia con buena calidad, la café de mediana calidad y roja de mala calidad.

7.8 Ensamblado de los transcriptomas

Debido a que a la fecha sólo se tiene disponible el genoma de la especie *S. moellendorffii*, y que se obtuvo un muy bajo porcentaje de alineamiento de las lecturas del transcriptoma de las especies objeto de estudio, se decidió realizar ensamblados *de novo* de los transcriptomas. Para ello, se usaron las lecturas de todos los tiempos muestreados para usarlas como marco de referencia para determinar los niveles de expresión de los diferentes genes en la especie correspondiente. Para construir el ensamblado del transcriptoma de referencia de cada especie se utilizó la herramienta Trinity, tomando en conjunto todas las librerías de cada especie. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7.7**.

El número de genes y transcritos en el caso de *S. denticulata* fue inusualmente alto, por lo que se analizaron con más detalle estos datos. Sin embargo, por cuestiones de tiempo y de los alcances de este trabajo, sólo se discutirán los resultados obtenidos para las demás

especies (en la sección de **Anexos** se incluye una discusión al respecto de los datos de *S. denticulata* y las razones por las que ésta no fue considerada).

TABLA 7.7 Resultados del ensamblado de los transcriptomas de especies de *Selaginella* contrastantes en la morfología y la TD.

	<i>S. extensa</i>	<i>S. pallescens</i>	<i>S. denticulata</i>	<i>S. lepidophylla</i>
No. de Genes	23429	24834	55600	32386
No. de Transcritos	56287	45811	108793	64189
Porcentaje de GC	53.22	51.98	51.54	50.84
#Estadísticas basadas en todos los transcritos				
Contig N50	4482	2064	3053	4061
Longitud media	1832	951	1343	976
Longitud promedio	2631.69	1313.05	1876.18	1962.86
Total de bases ensambladas	148130112	60152342	204115111	125993766
Total de lecturas	125956200	113237698	136189223	182787767
#Alineamiento del conjunto de lecturas				
Alineando una vez	51.46%	40.87%	50.82%	36.77%
Alineando más de una vez	39.78%	44.67%	41.31%	52.78%
Porcentaje de alineamiento global	91.24%	85.54%	92.13%	89.55%

Estadísticas de la especie secuencia según datos del Joint Genome Institute (<http://genome.jgi.doe.gov/Selmo1/Selmo1.info.html>):

Selaginella moellendorffii: ~110 Mpb (GC: 44.39%)
 22285 transcritos codificantes
 1701.63 pb promedio Gen
 1193.81 pb promedio Transcrito

7.9 Anotación Funcional

Los resultados de la anotación de los respectivos transcriptomas se muestran en la **Tabla 7.8**. En todos los casos, se consiguió hacer la anotación de más de la mitad de los genes, lo que fue similar a lo reportado por otros autores para otras especies. Sin embargo, es importante resaltar que campos como *Selaginella*, *Physcomitrella* y *Amborella* no son muy informativos, ya la anotación de sus genomas muestra un alto porcentaje de genes descritos como ‘putative’, ‘predicted’ o ‘hypothetical proteins’ (89.7%, 47.1% y 82.5%, respectivamente). La **Figura 7.13** muestra un ejemplo del tipo de descripciones asociadas a un gen en particular.

Considerando SwissProt, RefSeq, *Arabidopsis* y Pfam como los campos más descriptivos, se determinó el número de genes y las categorías que compartían dichas categorías en cada una de las especies (**Figura 7.12**).

TABLA 7.8 Resultados de la anotación de los transcriptomas de especies de *Selaginella* contrastantes en la morfología y la TD.

	<i>S. extensa</i>		<i>S. pallescens</i>		<i>S. lepidophylla</i>	
	Número	Porcentaje (%)	Número	Porcentaje (%)	Número	Porcentaje (%)
No. de Genes	23429	---	24834	---	32386	---
No. de Transcritos	56287	---	45811	---	64189	---
Genes con ID en SwissProt	10549	45.03	10441	42.04	14062	43.42
Genes con ID en RefSeq	11431	48.79	13218	53.23	16218	50.08
Genes con ID en <i>Arabidopsis thaliana</i>	10194	43.51	11552	46.52	14489	44.74
Genes con ID en <i>Selaginella moellendorffii</i>	11434	48.80	15624	62.91	13952	43.08
Genes con ID en <i>Physcomitrella patens</i>	10298	43.95	11641	46.88	12732	39.31
Genes con ID en <i>Amborella trichopoda</i>	10182	43.46	11613	46.76	13102	40.46
Genes con descripción en Pfam	8680	37.05	9662	38.91	10063	31.07
Genes con términos GO	11181	47.72	11577	46.62	15352	47.40
Total de Genes con Anotación	13468	57.48	16431	66.16	18400	56.81

El total de genes con anotación (resaltado en azul cian) corresponde a cualquier campo con descripción de alguna de las categorías usadas en la anotación.

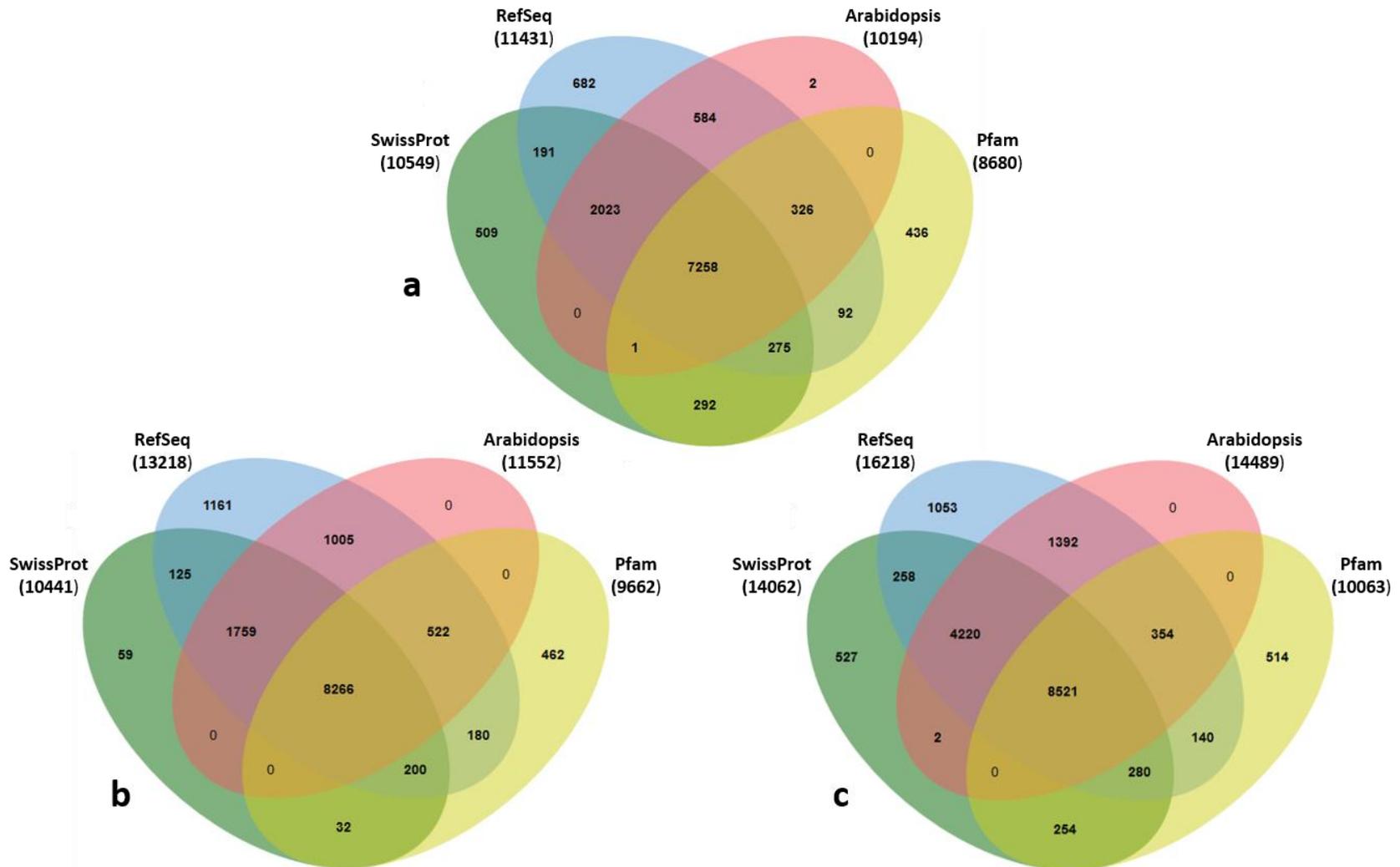


FIGURA 7.12 Número de genes con anotación en las principales categorías de cada una de las especies *Selaginella* analizadas. Anotación en SwissProt, RefSeq, *Arabidopsis thaliana* y dominios Pfam para *S. extensa* (a), *S. pallescens* (b) y *S. lepidophylla* (c).

```

mysql> select * from Annotation where Gene='SELexten_1197_c0_g1'\G;
***** 1. row *****
Transcript: SELexten_1197_c0_g1_i1
Gene: SELexten_1197_c0_g1
Trinity ID: TRINITY_DN1197_c0_g1_i1
SwissProt_ID: SKU5_ARATH
SwissProt_Info: OS:Arabidopsis thaliana | DE:Monocopper oxidase-like protein SKU5 | %Ident=52.56 |
length=546 | E-value=0 | BitScore=566
RefSeqPlants_ID: gi|659110852|ref|XP_008455444.1|
RefSeqPlants_Info: OS:Cucumis melo | DE:PREDICTED: L-ascorbate oxidase homolog | %Ident=59.32 |
AlignLength=531 | E-value=0 | BitScore=664
Arabidopsis_ID: AT1G21850.1
Arabidopsis_Info: DE:SKU5 similar 8 | %Ident=56.01 | AlignLength=541 | E-value=0 | BitScore=619
Selaginella_ID: EFJ31900
Selaginella_Info: DE:Putative uncharacterized protein | %Ident=79.3 | AlignLength=517 | E-value=0
| BitScore=868
Physcomitrella_ID: PP1S217_57V6.1
Physcomitrella_Info: DE:SKU5 similar 18 | %Ident=56.62 | AlignLength=544 | E-value=0 |
BitScore=611
Amborella_ID: ERN17406
Amborella_Info: DE:SKU5 similar 4 | %Ident=59.77 | AlignLength=532 | E-value=0 | BitScore=631
Pfam: PF07732.10^Cu-oxidase_3^Multicopper oxidase^33-147^E:5.1e-37 | PF00394.17^Cu-
oxidase^Multicopper oxidase^160-295^E:1e-34 | PF07731.9^Cu-oxidase_2^Multicopper oxidase^380-
515^E:1.8e-22
GO_Pfam: GO:0005507^molecular_function^copper ion binding |
GO:0016491^molecular_function^oxidoreductase activity | GO:0055114^biological_process^oxidation-
reduction process
GO_SwissProt: GO:0031225^cellular_component^anchored component of membrane |
GO:0046658^cellular_component^anchored component of plasma membrane |
GO:0048046^cellular_component^apoplast | GO:0005618^cellular_component^cell wall |
GO:0016020^cellular_component^membrane | GO:0009505^cellular_component^plant-type cell wall |
GO:0005886^cellular_component^plasma membrane | GO:0009506^cellular_component^plasmodesma |
GO:0005774^cellular_component^vacuolar membrane | GO:0005507^molecular_function^copper ion binding
| GO:0016491^molecular_function^oxidoreductase activity | GO:0009932^biological_process^cell tip
growth

```

FIGURA 7.13 Ejemplo del resultado de la anotación de un gen en particular de la especie *S. extensa*. Como ejemplo se muestra la anotación del gen “SELexten_1197_c0_g1”. El formato observado es el resultado de MySQL, cada uno de los principales campos se resaltan en rojo. También se incluyen descripciones de cada uno de los resultados de Blast así como los identificadores generados por Trinity.

Como una primera comparación entre las diferentes especies, y sobre la base de los identificadores de *Arabidopsis* y *Selaginella* se determinó cuántos de ellos estaban compartidos (**Figura 7.14**). Se encontró un mayor número de genes compartidos, tanto con los identificadores de *Arabidopsis* como de *Selaginella*, entre las plantas con una misma morfología (*S. pallescens* y *S. lepidophylla*, ambas con morfología de roseta) que entre plantas adaptadas a ambientes similares (climas áridos) y que comparten una misma característica como la TD (*S. extensa* y *S. lepidophylla*).

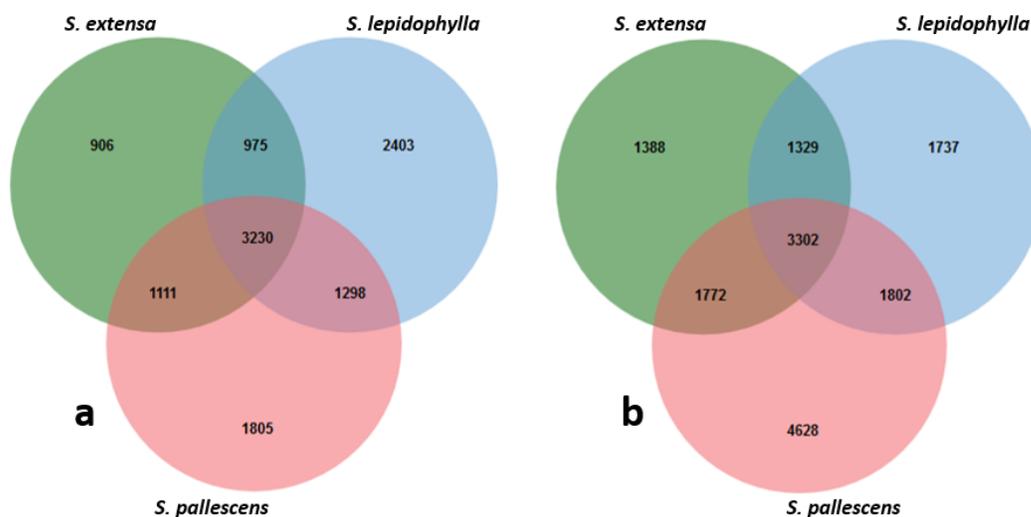


FIGURA 7.14 Comparación de las diferentes especies de *Selaginella* en base a los identificadores de *Arabidopsis* y *Selaginella*. La anotación con respecto a los identificadores de *A. thaliana* se muestra a la izquierda (a), mientras que la de *S. moellendorffii* a la derecha (b).

7.10 Análisis de expresión diferencial

Tomando como condición control los niveles de expresión en tejidos completamente hidratados (100%), se determinó el número de genes que cambiaron su expresión como respuesta a la deshidratación o rehidratación. La **Tabla 7.9** muestra el número de genes inducidos o reprimidos en cada especie. En el caso de las especies tolerantes (específicamente *S. extensa* y *S. lepidophylla*) en casi todas las condiciones se obtuvo un mayor número de genes inducidos que reprimidos, mientras que en la especie con tolerancia parcial (refiriéndonos a *S. pallescens*) se obtuvo lo contrario.

TABLA 7.9 Número de genes diferencialmente expresados por condición en especies de *Selaginella* contrastantes en la morfología y la TD.

Condición ²	<i>S. extensa</i>		<i>S. pallescens</i>		<i>S. lepidophylla</i>	
	Inducidos ¹	Reprimidos ¹	Inducidos ¹	Reprimidos ¹	Inducidos ¹	Reprimidos ¹
70 vs. 100	103	72	143	207	578	218
50 vs. 100	593	108	296	222	437	316
10 vs. 100	553	445	368	529	1536	553
2h vs. 100	490	329	420	514	942	493
6h vs. 100	159	281	279	438	1141	288

¹El número de genes fue filtrado en base a un $\log_{2}FC \geq 2$ ó $\log_{2}FC \leq -2$, y un FDR ≤ 0.01

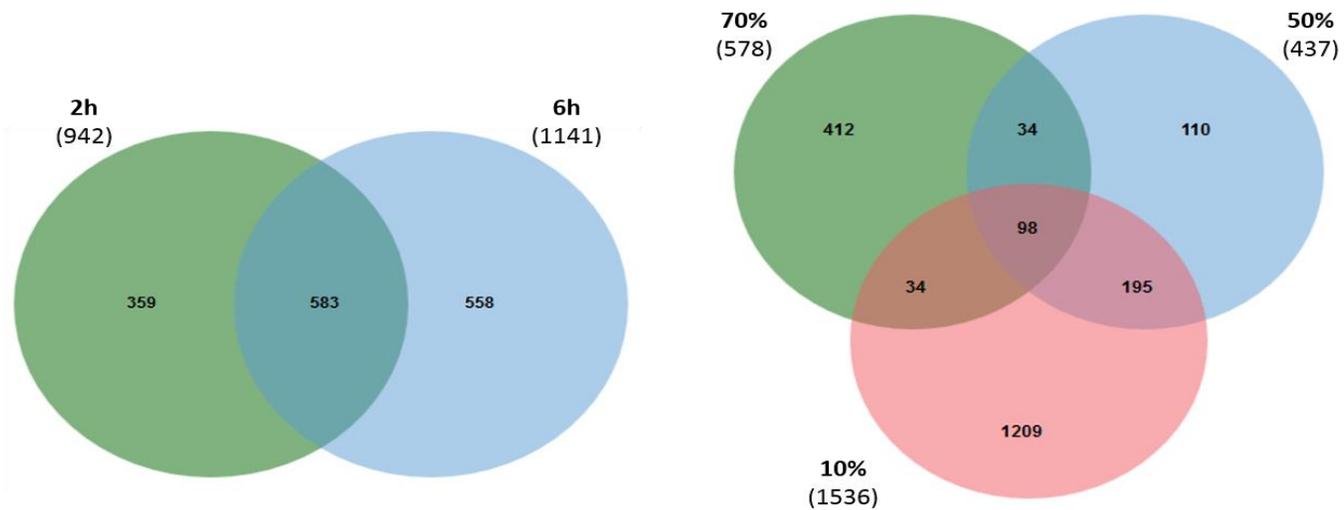
²Cada una de las condiciones se refiere al cambio en la expresión génica comparadas con el estado completamente hidratado de las frondas (100% de contenido de agua). Las tres primeras corresponden a la expresión génica en las frondas cuando alcanzan el 70, 50 y 10% del contenido de agua, respectivamente. Las dos últimas corresponden a la expresión génica a las 2 y 6 h de rehidratación, respectivamente.

Considerando en conjunto todas las etapas de pérdida de agua y por otro lado los eventos de rehidratación, se determinó que hay un grupo de genes comunes a todas las condiciones de deshidratación y rehidratación así como un número significativo que son específicos a cada etapa (**Figuras 7.15, 7.16 y 7.17**).

Con la finalidad de visualizar el comportamiento de todos los genes que en al menos una condición fueron estadísticamente significativos, éstos se graficaron como se muestra en la **Figura 7.18**. Se encontró que las especies *S. lepidophylla* y *S. extensa* (ambas tolerantes) presentan perfiles de expresión mucho más variados comparadas con la especie *S. pallescens*, la cual mostró, en casi todas sus condiciones, un mayor número genes reprimidos (**Tabla 7.9**).

También se comparó el número de genes de respuesta a la deshidratación o rehidratación comunes entre especies, en base a su identificador de *Selaginella* (**Figura 7.19**). Se determinó que existen pocos genes que responden a la deshidratación o rehidratación comunes a las tres especies, ya que en su mayoría resultaron específicos de cada especie.

I
N
D
U
C
I
D
O
S



R
E
P
R
I
M
I
D
O
S

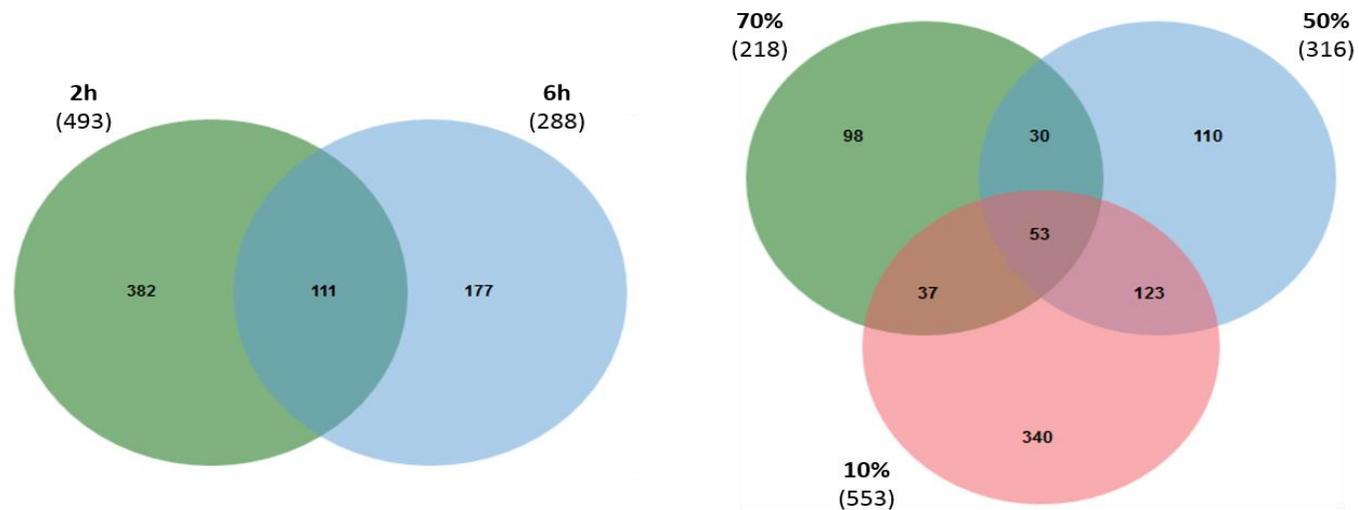
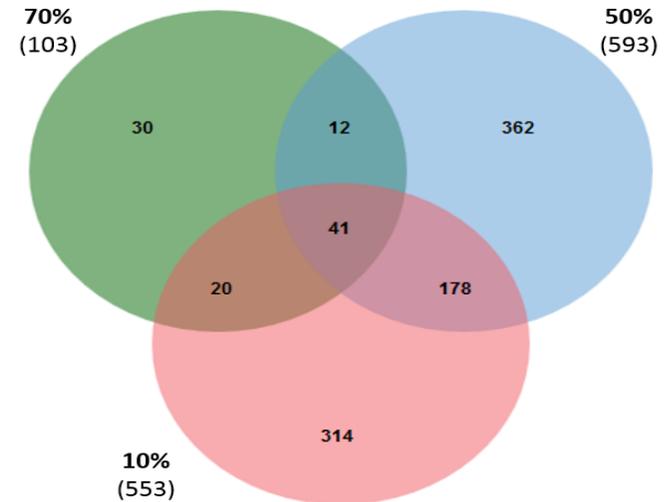
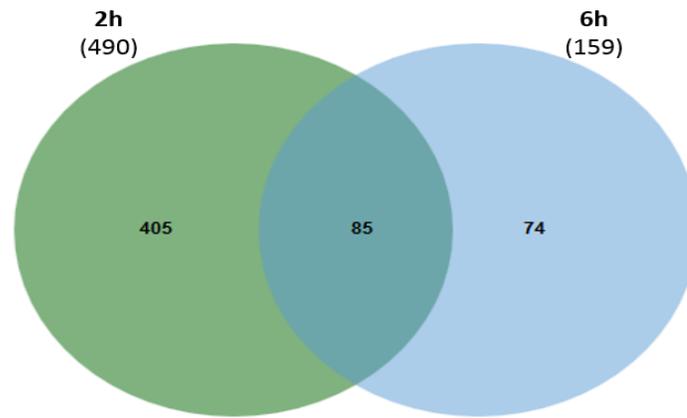


FIGURA 7.15 Genes diferencialmente expresados en *S. lepidophylla* durante la deshidratación y subsecuente rehidratación. A la derecha se muestran genes diferencialmente expresados cuando las frondas alcanzan contenidos de agua del 70, 50 y 10%, y a la izquierda a las 2 y 6 h después de la rehidratación.

I
N
D
U
C
I
D
O
S



R
E
P
R
I
M
I
D
O
S

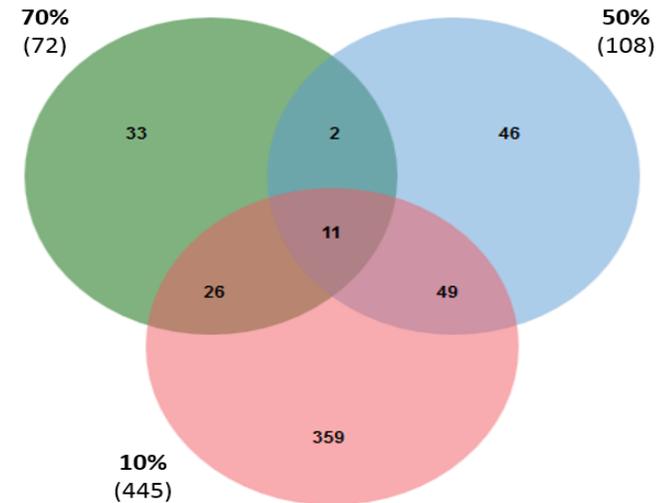
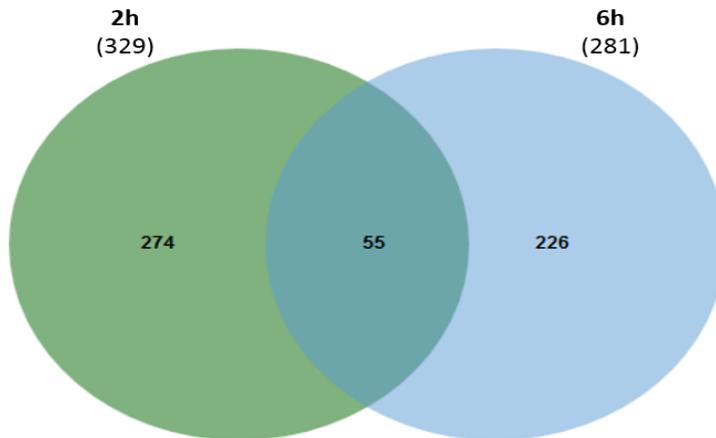
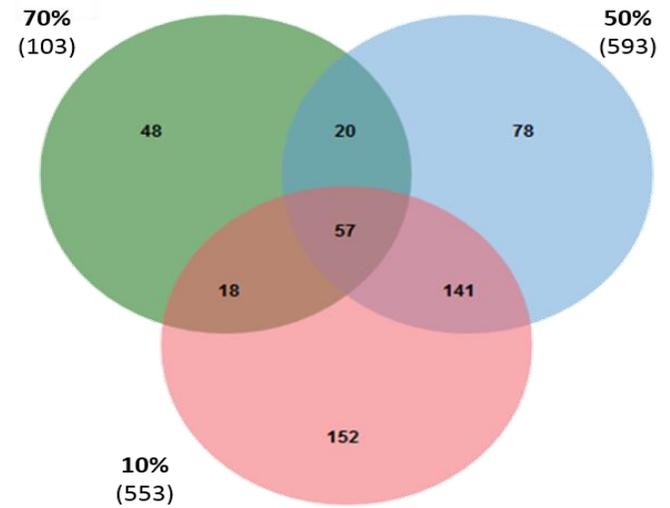
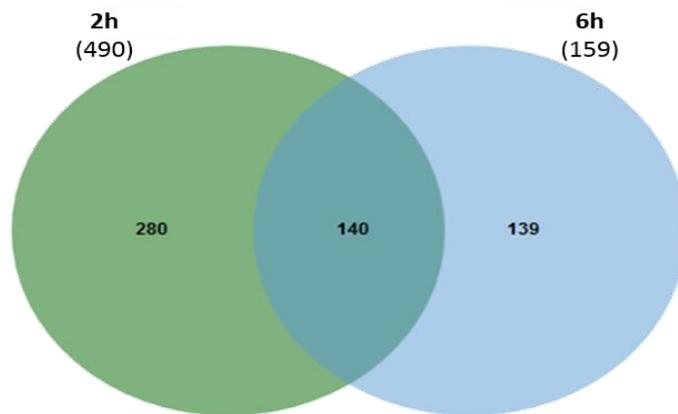


FIGURA 7.16 Genes diferencialmente expresados en *S. extensa* durante la deshidratación y subsecuente rehidratación. A la derecha se muestran genes diferencialmente expresados cuando las frondas alcanzan contenidos de agua del 70, 50 y 10%, y a la izquierda a las 2 y 6 h después de la rehidratación.

I
N
D
U
C
I
D
O
S



R
E
P
R
I
M
I
D
O
S

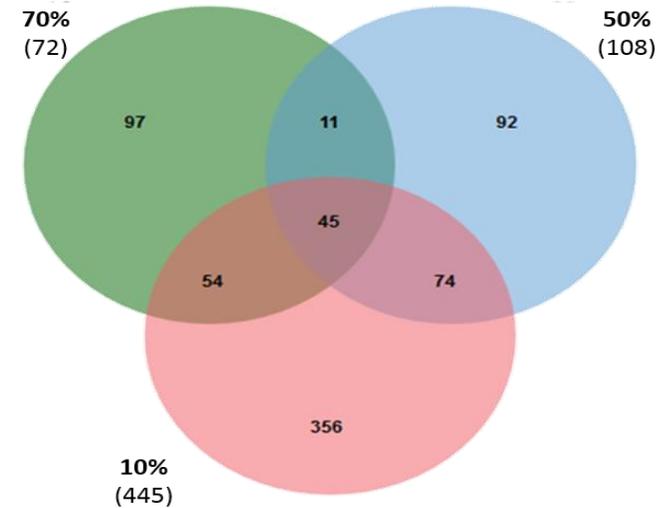
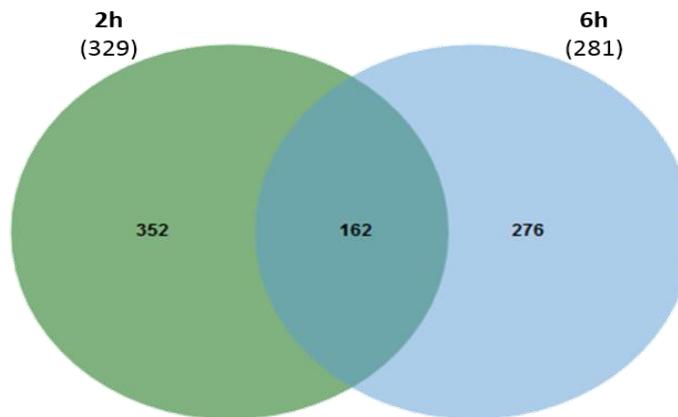


FIGURA 7.17 Genes diferencialmente expresados en *S. pallescens* durante la deshidratación y subsecuente rehidratación. A la derecha se muestran genes diferencialmente expresados cuando las frondas alcanzan contenidos de agua del 70, 50 y 10%, y a la izquierda a las 2 y 6 h después de la rehidratación.

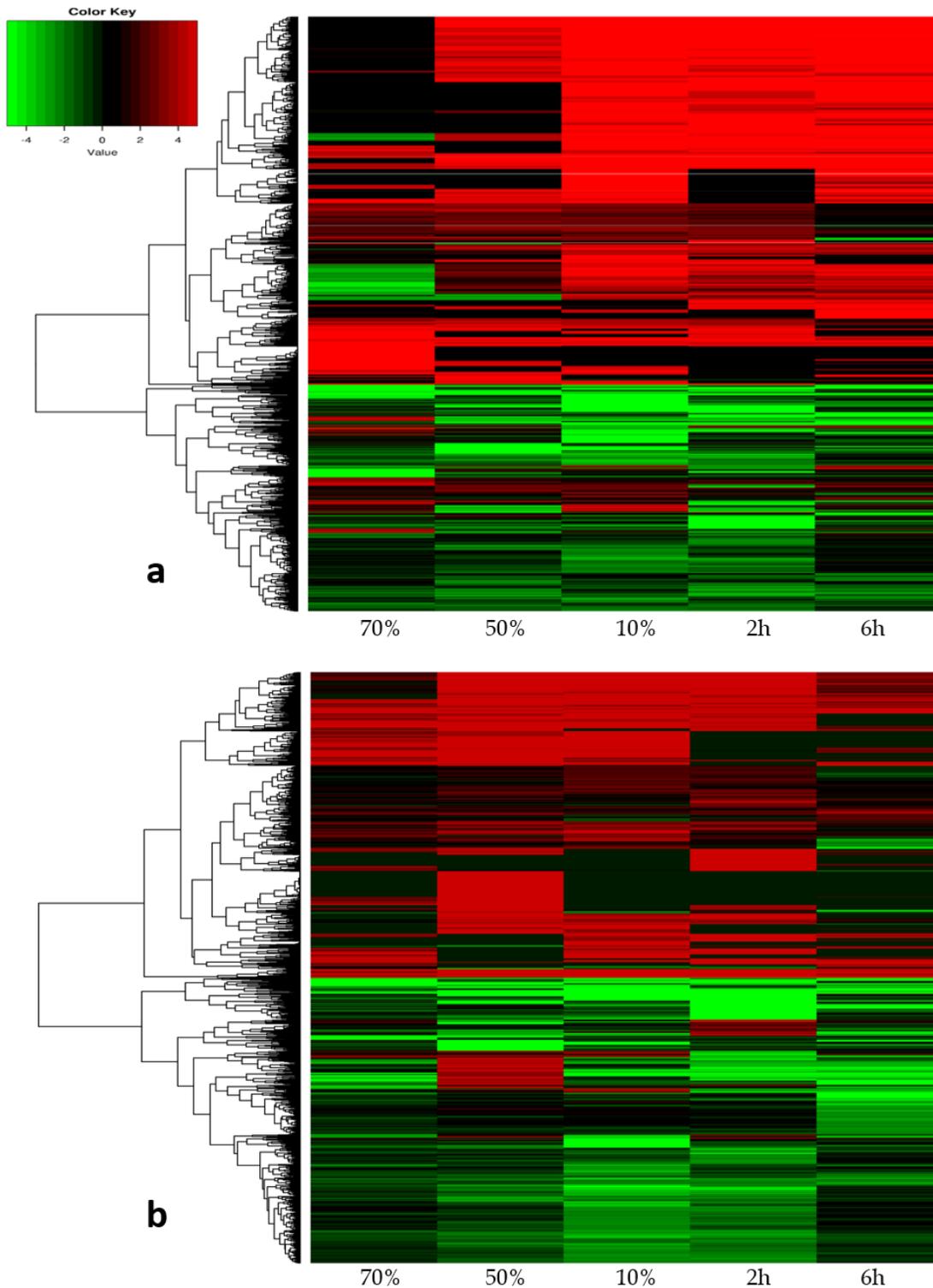


FIGURA 7.18 Patrones de expresión de los genes diferencialmente expresados durante la deshidratación y subsecuente rehidratación. La gráfica de mapa de calor muestra los cambios en la expresión de genes que fueron diferencialmente expresados a diferentes contenidos de agua (%) y tiempos de rehidratación (h). El de la parte superior (**a**) corresponde a *S. lepidophylla* representando un total de 3555 genes, el de la inferior (**b**) a *S. extensa* representando 2074 genes.

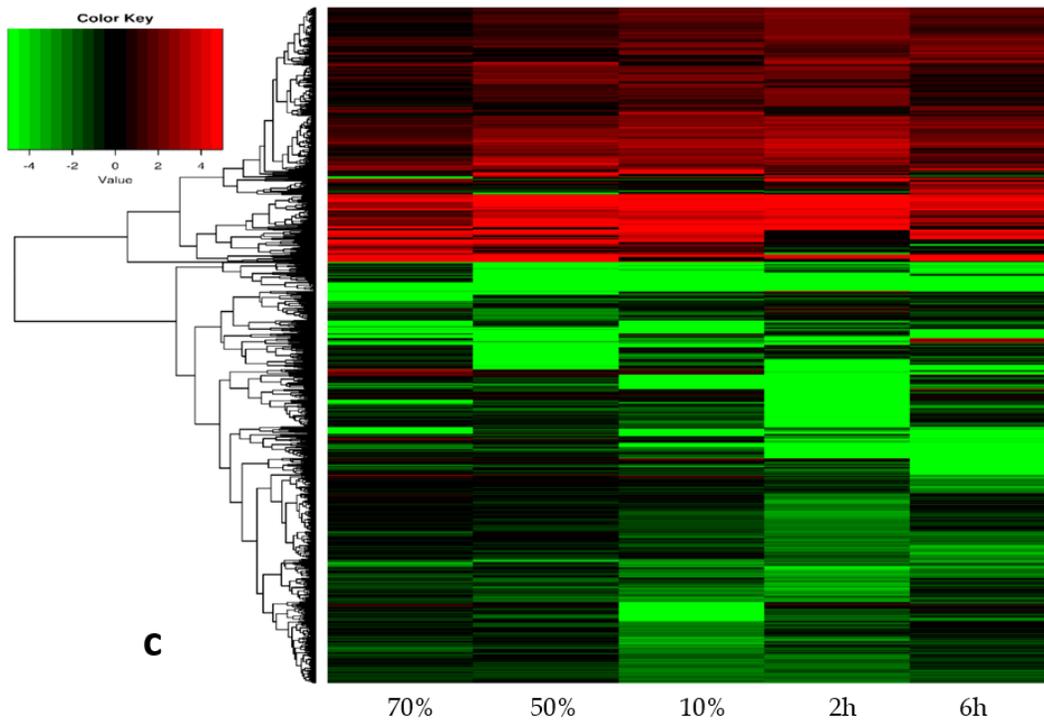


FIGURA 7.18 Patrones de expresión de los genes diferencialmente expresados durante la deshidratación y subsecuente rehidratación (continuación). La gráfica de mapa de calor muestra los cambios en la expresión de genes que fueron diferencialmente expresados a diferentes contenidos de agua (%) y tiempos de rehidratación (h). Mapa de calor de la especie *S. pallescens* (c) representando un total de 1962 genes.

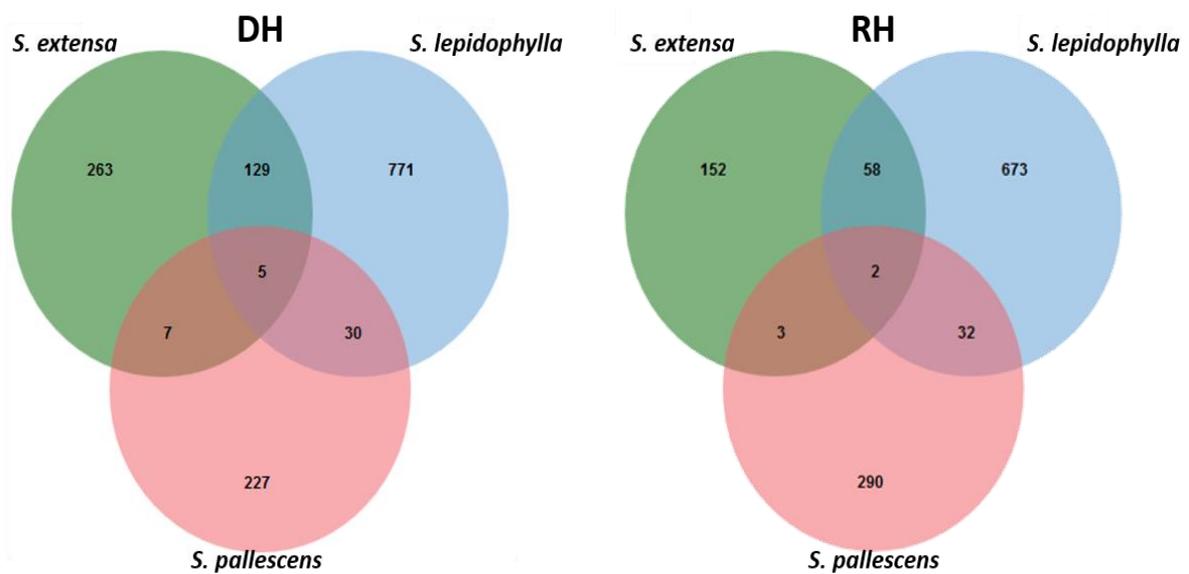


FIGURA 7.19 Número de genes inducidos diferencialmente expresados entre especies. Se incluyen todos los genes cuya expresión se modificó en las diferentes etapas de deshidratación (DH) o rehidratación (RH). Se consideraron todos aquellos genes anotados en base a *S. moellendoffii*.

7.11 Enriquecimientos funcionales

La categorización se realizó acorde a la clasificación MapMan, considerando todos aquellos genes diferencialmente expresados que en su anotación contenían un identificador de *Arabidopsis*. Es importante recalcar que de todos los genes diferencialmente expresados, aproximadamente la mitad tuvieron un homólogo en *Arabidopsis* y son los que se incluyen en este análisis. A continuación se incluyen gráficas de las categorías funcionales enriquecidas (**Figuras 7.20, 7.21 y 7.22**), y en la sección de **Anexos**, se tienen listas y conteos de subcategorías relevantes. Se compararon las categorías funcionales enriquecidas inducidas entre las especies tolerantes (*S. extensa* y *S. lepidophylla* morfología postrada y de roseta, respectivamente), así como las especies con la misma morfología pero contrastantes en la característica de tolerancia a la pérdida de agua (*S. lepidophylla* y *S. pallescens*, ambas con morfología de roseta). Todo esto se realizó con la finalidad de discernir los mecanismos o procesos que confieren la TD (**Figuras 7.23 y 7.24**).

Considerando todas las etapas de la deshidratación y la rehidratación, en total se obtuvieron 28 categorías funcionales enriquecidas inducidas para la especie *S. lepidophylla*, 23 para la especie *S. extensa*, y 18 para *S. pallescens*. Entre las categorías del MapMan que resultaron enriquecidas comunes a las plantas tolerantes y que no resultaron significativas en la especie con tolerancia parcial, se encontró el metabolismo de aminoácidos y de azúcares, y señalización sólo por resaltar algunas. Varias de las categorías presentes en las plantas TD también estuvieron presentes en la planta con tolerancia parcial, pero en muchos casos presentaban un menor número de genes o actuaban en etapas distintas (p. ej., redox, metabolismo de lípidos, transporte, etc.). También se encontraron categorías posiblemente relevantes para la tolerancia a la desecación, que fueron específicas de alguna especie, como algunas relacionadas con la pared celular en *S. lepidophylla*.

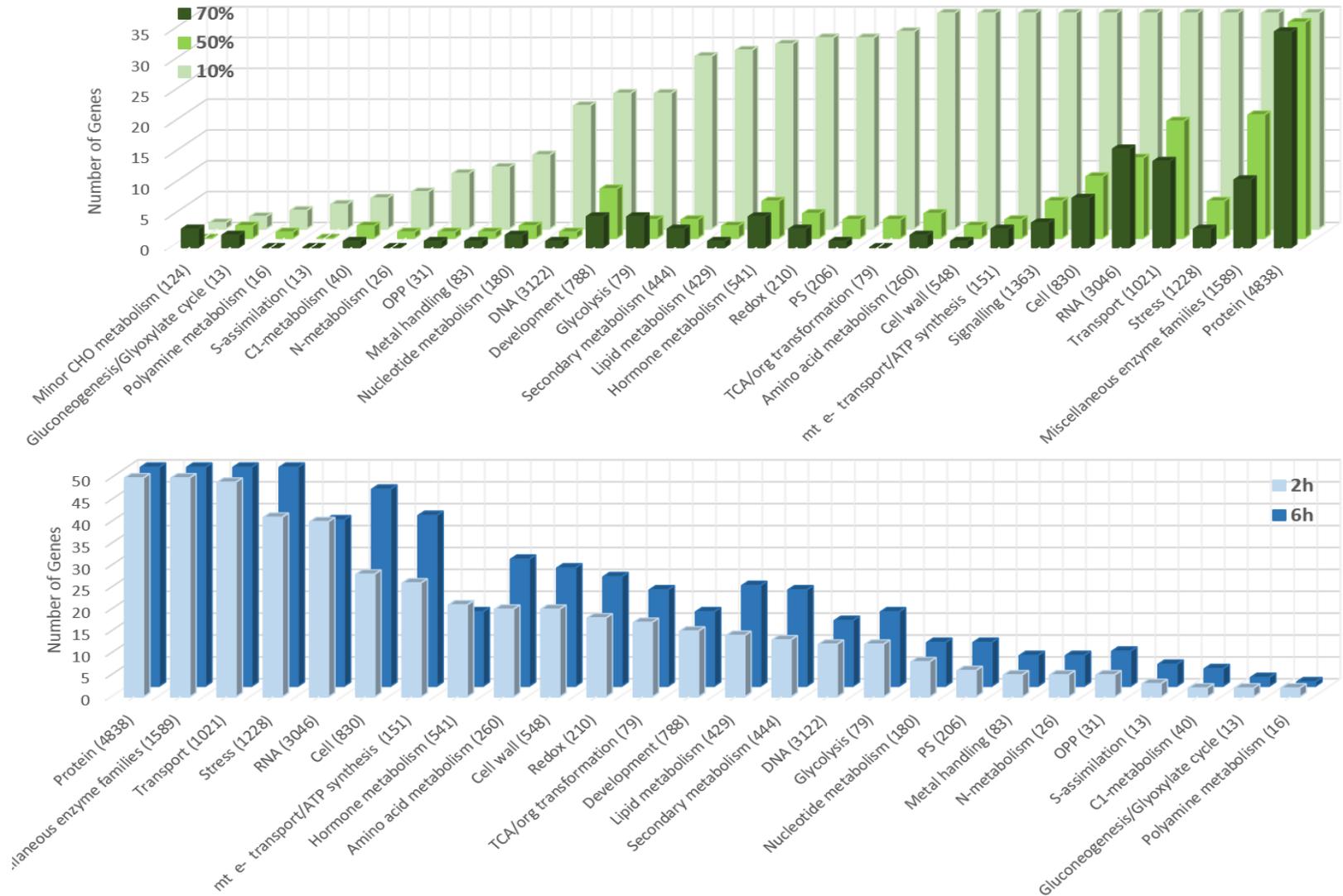


FIGURA 7.20 Categorías funcionales enriquecidas de genes inducidos en *S. lepidophylla*. Se muestran las categorías enriquecidas en tres etapas de la deshidratación (en verde) y en dos tiempos de la subsecuente rehidratación (en azul).

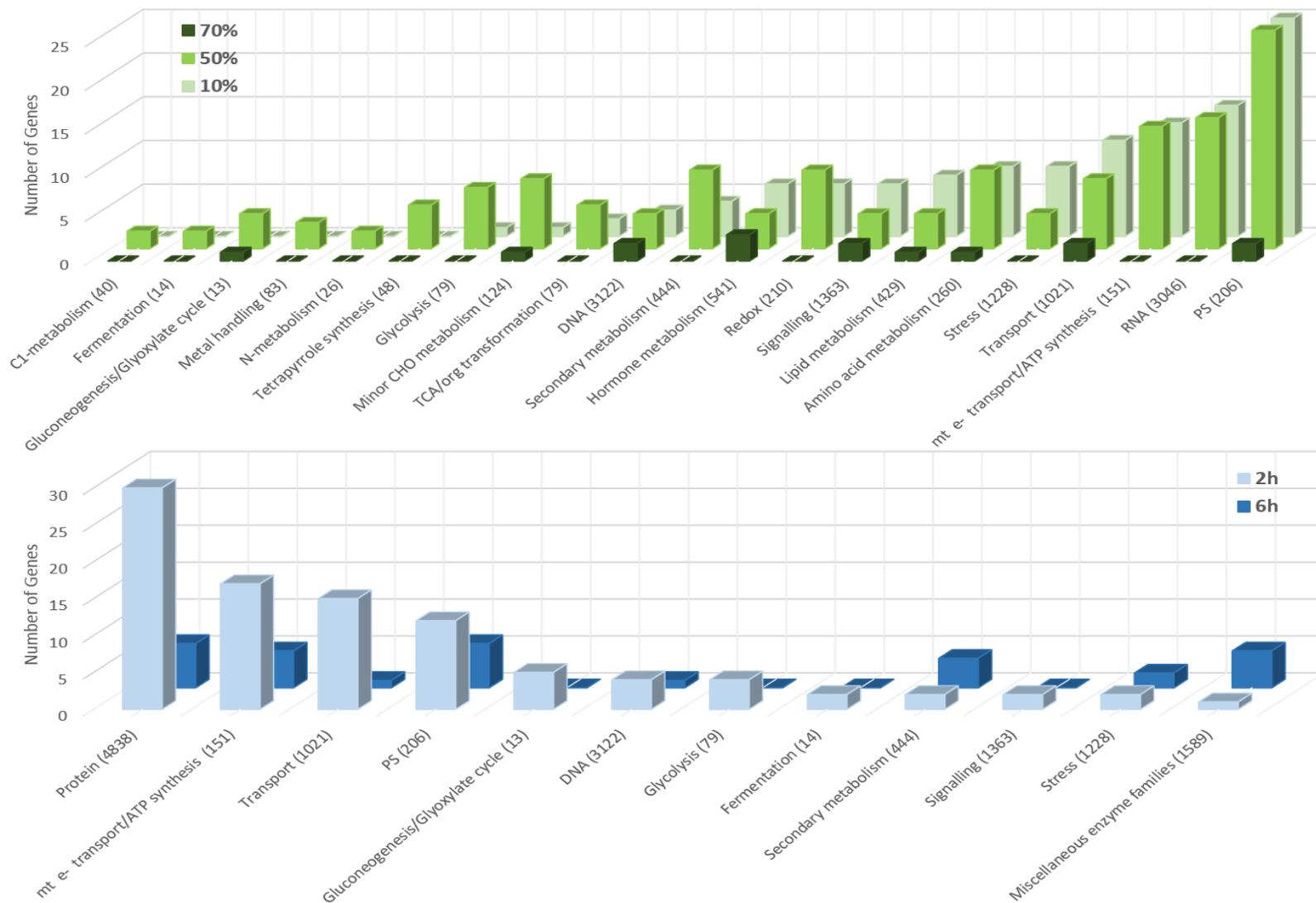


FIGURA 7.21 Categorías funcionales enriquecidas de genes inducidos en *S. extensa*. Se muestran las categorías enriquecidas en tres etapas de la deshidratación (en verde) y en dos tiempos de la subsecuente rehidratación (en azul).

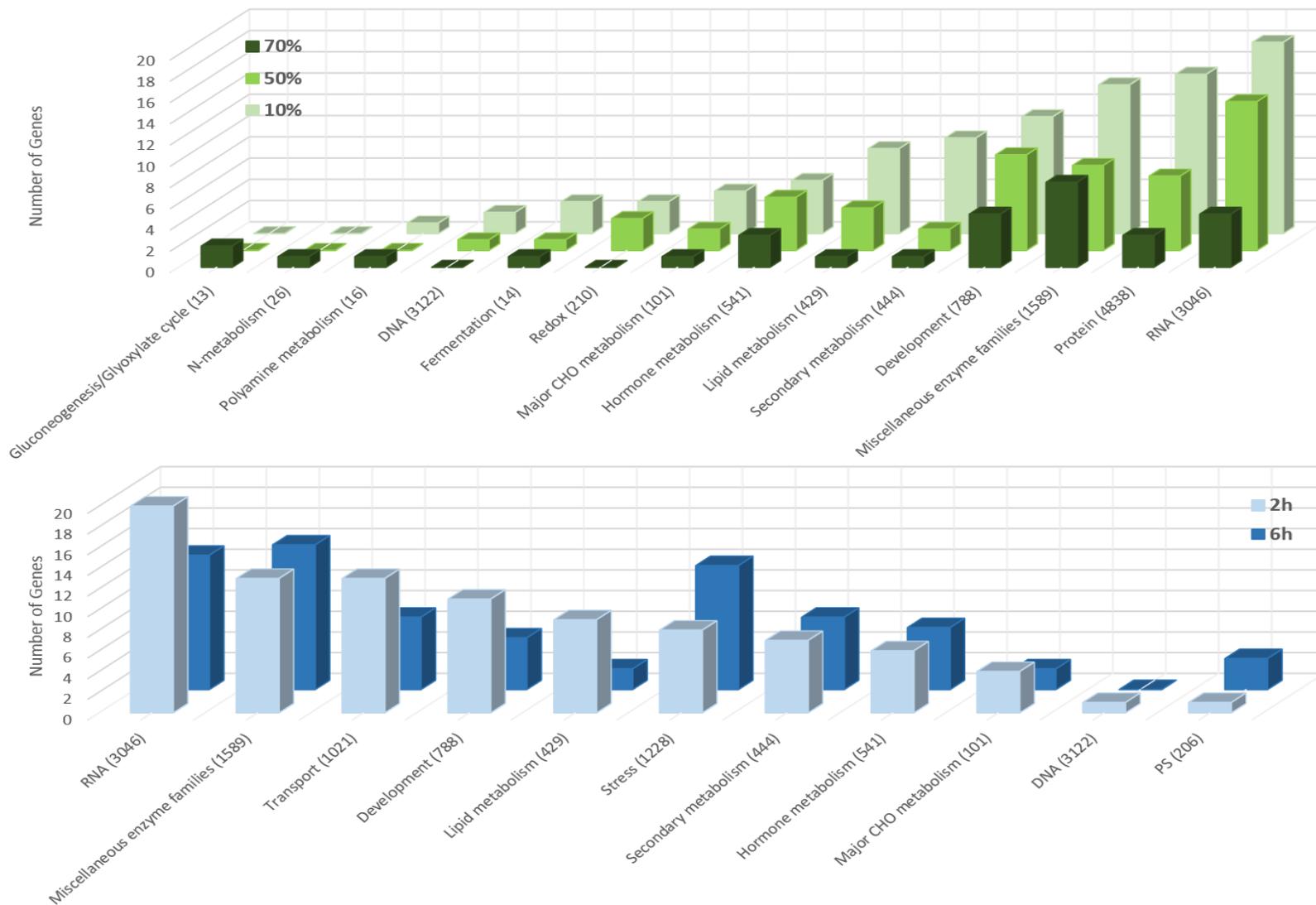


FIGURA 7.22 Categorías funcionales enriquecidas de genes inducidos en *S. pallescens*. Se muestran las categorías enriquecidas en tres etapas de la deshidratación (en verde) y en dos tiempos de la subsecuente rehidratación (en azul).

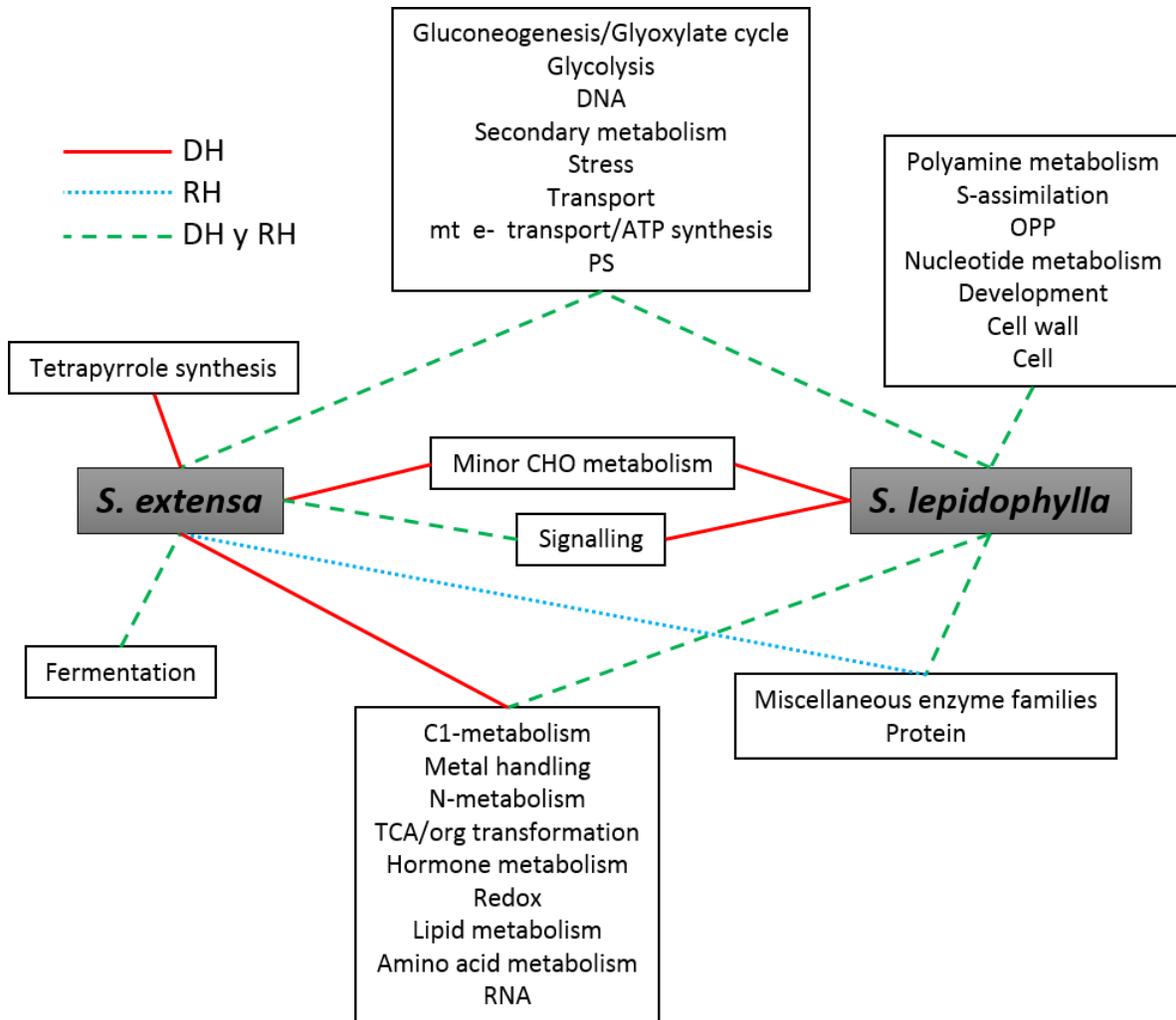


FIGURA 7.23 Categorías funcionales enriquecidas en común y únicas a *S. extensa* y *S. lepidophylla*. Se muestran las categorías funcionales que resultaron enriquecidas de genes inducidos en dos plantas TD con morfologías contrastantes (*S. extensa* y *S. lepidophylla*, con morfología postrada y de roseta, respectivamente). Las líneas rojas indican categorías que resultaron enriquecidas sólo en la deshidratación (DH), las líneas azules aquellas que fueron específicas de la rehidratación (RH), y las verdes para todas aquellas categorías que resultaron comunes tanto a la deshidratación como a la rehidratación (DH y RH).

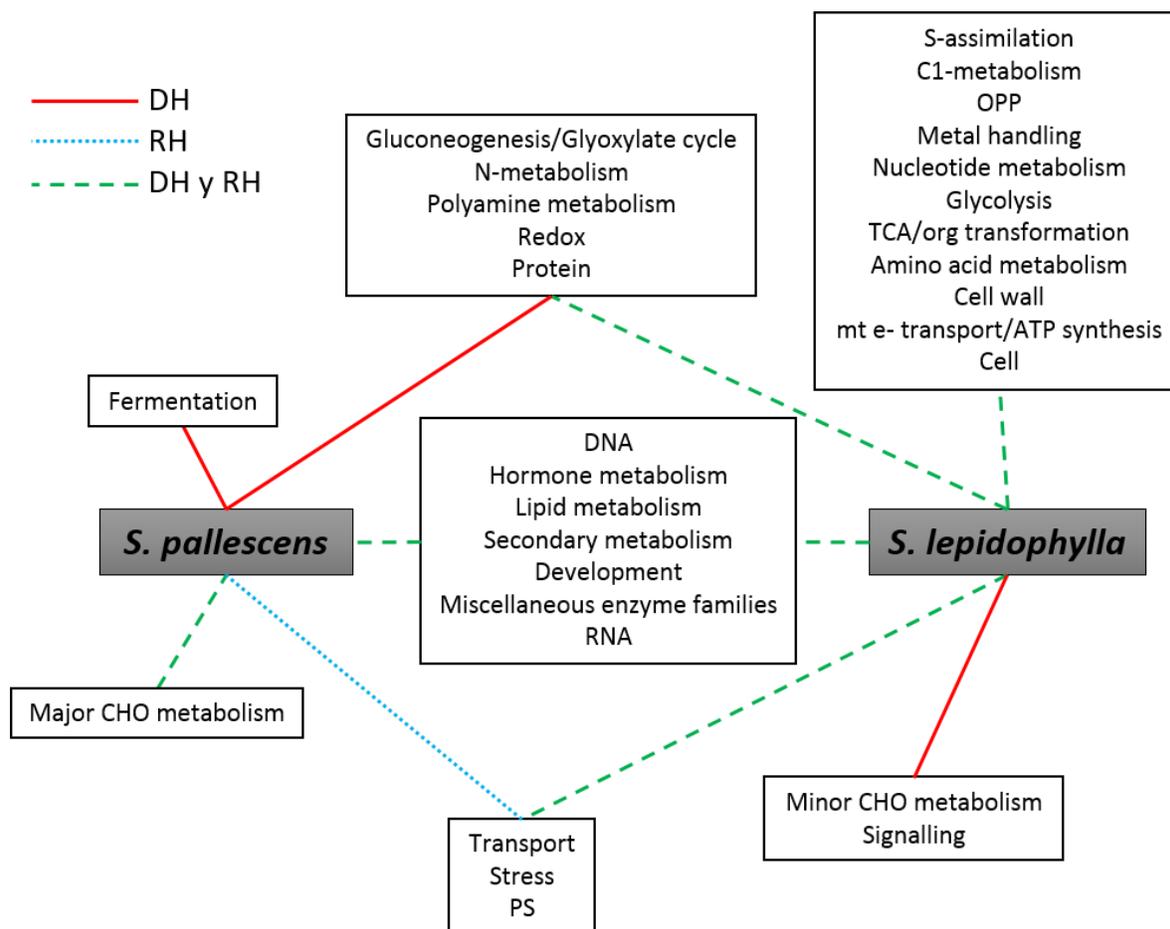


FIGURA 7.24 Categorías funcionales enriquecidas en común y únicas a *S. pallescens* y *S. lepidophylla*. Se muestran las categorías funcionales que resultaron enriquecidas de genes inducidos en una especie intolerante (*S. pallescens*) y una tolerante (*S. lepidophylla*), ambas con morfología de roseta. Las líneas rojas indican categorías que resultaron enriquecidas sólo en la deshidratación (DH), las líneas azules aquellas que fueron específicas de la rehidratación (RH), y las verdes para todas aquellas categorías que resultaron comunes tanto a la deshidratación como a la rehidratación (DH y RH).

VIII. DISCUSION

8.1 Género *Selaginella* como modelo de estudio y fuente para el descubrimiento de nuevas especies TD

El escrutinio para la selección de este particular modelo de estudio se restringió a plantas vasculares, tomando en cuenta las dos siguientes consideraciones: 1) la inclusión de miembros tanto tolerantes como intolerantes a la desecación; 2) que fueran parte de la misma familia o género, o 3) que fueran especies filogenéticamente cercanas.

Existen plantas de resurrección reportadas en México que van desde pteridofitas (licofitas y helechos) hasta algunas angiospermas (**Tabla 7.1**). Por ello, el primer criterio de selección se basó en la riqueza de cada una de sus familias para que fuera más fácil obtener los especímenes necesarios para este estudio.

Como muestra la **Tabla 7.1**, los grupos más abundantes en cuanto a especies TD y número de miembros fueron las familias *Selaginellaceae* y *Pteridaceae* con 2 y 4 especies TD, respectivamente, y un total de 83 y 62 especies reportadas por la CONABIO (2008), respectivamente. El segundo criterio de selección se basó en la revisión de la literatura para determinar de qué grupo había más estudios relacionados a la TD encontrando que un miembro de la familia *Selaginellaceae* (*S. lepidophylla*) es una de las plantas de resurrección más estudiadas (**Tabla 3.1**), ya que esta especie se ha usado para algunos estudios metabólicos, ultraestructurales y fisiológicos, además de los ya mencionados (Pampurova y Van Dijck, 2014). Por estas razones se eligió el género *Selaginella* como grupo de estudio.

Después de seleccionar el género *Selaginella*, se inició la tarea de recopilar las especies que han sido reportadas en México tanto por información de la CONABIO como del Herbario Nacional de México (MEXU). De este modo, se elaboró una base de datos con los nombres de las especies y su distribución. En este trabajo se logró identificar otras 4 especies (*S. convoluta*, *S. peruviana*, *S. pilifera* y *S. sellowii*) reportadas como tolerantes en el trabajo de Proctor y Pence (2002), pero que no indicadas con distribución en nuestro país. Con un total de 6 especies TD (**Tabla 7.2**), el género *Selaginella* se convirtió en el grupo con mayor número de plantas de resurrección reportadas en México.

Posteriormente, fue necesario obtener el material biológico mediante solicitud a colecciones botánicas y colectas en campo (**Figura A1**, en **Anexos**). Partiendo del principio de que en sitios con bajos niveles de precipitación era más probable encontrar especies TD, y en sentido contrario, encontrar plantas intolerantes a la desecación (no-TD) en ambientes con mayor disponibilidad de agua, se seleccionaron sitios de colecta en base a sus niveles de precipitación anuales (**Tabla 7.3**) y el número de especies de *Selaginella* reportado (**Figura 7.1**). Los criterios de colecta resultaron adecuados al obtener especies de ambientes contrastantes que diferían en la TD y con morfologías muy distintas (**Tabla 7.4; Figura A2**, de la sección de **Anexos**). Mediante esta estrategia se cubrió uno de los objetivos del presente trabajo.

Del material biológico obtenido (de colectas en campo o donado) se realizaron ensayos para determinar si los especímenes eran tolerantes o intolerantes. Para ello se utilizaron frondas (**Figura A3**, partes de la planta), las cuales fueron expuestas a varios ciclos de deshidratación y posterior rehidratación. Un estudio previo, evaluó la viabilidad en períodos de tiempo prolongados bajo condiciones controladas (Walters *et al.*, 2005), encontró que está podía definirse mediante el cálculo del área de la hoja que se mantiene verde después de ser rehidratada. Estos autores concluyeron que tuvieron que pasar más de 6 años para que la viabilidad en frondas de *S. lepidophylla* se reduzca al 50%, mientras que en otra planta de resurrección como *M. flabellifolia* esta misma reducción en viabilidad se observó poco después de 1 año.

Se determinó la tolerancia de las especies incluidas en la **Tabla 7.4**, algunas de ellas ya reportadas como TD (p. ej., *S. lepidophylla* y *S. sartorii*). Lo anterior se realizó mediante un experimento sencillo que consistió en la toma de fotografías de un mismo tejido en estado hidratado, deshidratado y rehidratado por varios ciclos. Las plantas intolerantes presentaron oxidación al ser rehidratadas desde el primer ciclo, situación que se hizo más evidente en el tercer ciclo de rehidratación. En cambio, las plantas tolerantes mantienen una coloración verde brillante aún en el tercer ciclo de rehidratación, como se muestra en la **Figura 7.2**. Mediante esta metodología se estableció a *S. extensa* como TD, aunque ésta especie no ha sido, hasta el momento, reportada como tal. Inclusive, el tejido se rehidrató después de más

de 8 meses de haber sido hidratado por última vez y todavía conservaba esa tonalidad verde brillante (**Figura A4**, en **Anexos**).

En este trabajo se analizaron 9 especies distintas de *Selaginella*, representando sólo un poco más del 10% del total de especies reportadas en el territorio nacional (**Tabla 7.2**). Se logró por primera vez clasificar a una de ellas como TD, por lo que este grupo presenta un gran potencial para el descubrimiento de nuevas especies TD.

A pesar de los problemas que conlleva la experimentación con especies que no son modelos de estudio y de que los reportes científicos son limitados, la selección del género *Selaginella* es importante e interesante, ya que representa una gran oportunidad para generar nuevo conocimiento sobre un grupo de plantas poco estudiadas.

8.2 Diferencias en la pérdida de agua y actividad fotosintética entre diferentes especies de *Selaginella*

En plantas con tolerancia a la desecación modificada (**Figura 3.3**) la pérdida de agua es más lenta (p. ej., puede ocurrir en un período de días o inclusive semanas en su ambiente natural [Proctor y Pence, 2002]) comparada con aquellas que presentan tolerancia constitutiva (líquenes, algas y briofitas desérticas pueden alcanzar un secado casi completo dentro de una hora [Toldi *et al.*, 2009]). Algunos autores como Yobi *et al.* (2012) hacen énfasis en que la velocidad de la pérdida de agua resulta crucial al proveer más tiempo para la inducción de mecanismos de protección en las especies TD a diferencia de las no-TD.

Se realizaron cinéticas de pérdida de agua con la finalidad de determinar si las especies TD evaluadas en este trabajo efectivamente pierden más lentamente el agua comparadas con las no-TD (**Figura 7.3**, y **Figura A5** de la sección de **Anexos**). Se observó que en el caso de las especies con morfología de roseta, la pérdida de agua fue más lenta en la planta tolerante, en comparación con aquella sensible a la sequía (**Figura 7.3**). Esta característica podría ser necesaria, en principio, para conferir más tiempo en la inducción de mecanismos de protección para evitar el daño celular producido por el estrés hídrico. El estudio realizado por

Yobi *et al.* (2012) también muestra este mismo comportamiento al analizar especies de *Selaginella* que difieren en su capacidad para tolerar la desecación.

Sin embargo, esto no se cumplió en el caso de las especies postradas (**Figura 7.3**, y **Figura A5** de **Anexos**), ya que la pérdida de agua entre especies tolerantes e intolerantes no resultó estadísticamente significativa. Tampoco se observó una tendencia clara. Este comportamiento sugiere que las plantas *Selaginella* TD con morfología postrada no pierden más lento el agua que sus contrapartes intolerantes. No obstante, será necesario realizar más estudios para tener resultados más concluyentes sobre este aspecto.

Las plantas TD tienen la capacidad de retomar su ciclo de vida una vez que se rehidratan, activando procesos tales como la fotosíntesis una vez que el estatus de agua se recupera en la célula. Por lo tanto, la medición de la actividad fotosintética puede ser un buen parámetro para determinar la viabilidad de un tejido después de la rehidratación en el supuesto de que se traten de plantas homoioclorofilas (**Figura 3.3**), como es el caso de especies del género *Selaginella*. Se sabe que la asimilación de CO₂ disminuye en condiciones de estrés hídrico, debido principalmente a una reducción en la conductancia estomática y la concentración de CO₂ en cloroplasto más que un efecto directo del contenido de agua (Dinakar *et al.*, 2012). En la **Figura 7.6** se observa que en todas las especies hubo una disminución significativa de la fotosíntesis al poco tiempo de haber iniciado la pérdida de agua, cuantificando incluso valores negativos, indicadores de procesos respiratorios, durante la deshidratación. Estos experimentos no permitieron determinar el contenido de agua en el cual las especies estudiadas suspenden la asimilación de CO₂, pero esto parece suceder cuando el contenido de agua se reduce entre el 55 – 50% para la especie tolerante *S. lepidophylla* (**Figura 7.6**). Tendencias similares se han observado en la planta de resurrección *Sporobolus stapfianus*, en la que la fotosíntesis decrece gradualmente conforme el contenido de agua disminuye, hasta detenerse por completo cuando se alcanza un contenido relativo de agua de alrededor del 45% (Griffiths *et al.*, 2014). Estudios como el realizado por Pandey *et al.* (2010) en la especie tolerante *S. bryopteris* muestran que la fotosíntesis se restablece a sus niveles normales a las 12 h de la rehidratación subsecuente a un proceso de desecación. La recuperación de los niveles fotosintéticos en la rehidratación no fue lo esperado en las plantas

de resurrección incluidas en este estudio (*S. lepidophylla* y *S. extensa*), aunque esto pudo haberse debido a la sensibilidad del equipo ante el exceso de agua. Este problema se resolvió al analizar la actividad de fotosintética en base a la diferencia entre la entrada y salida de CO₂, donde se observó que las plantas tolerantes rehidratadas alcanzan niveles más cercanos al estado inicial anterior a la deshidratación (**Figura 7.5**). Con este ajuste de los datos se logró demostrar que frondas de una especie TD, como *S. lepidophylla*, se mantienen viables al tener la capacidad de activar la fotosíntesis, en cuanto a fijación de CO₂ se refiere, después de un tratamiento de desecación.

Es importante mencionar que estas mediciones de fotosíntesis representan un ensayo preliminar, ya que para tener resultados totalmente concluyentes es necesario repetir el ensayo considerando otros parámetros, como la intensidad luminosa, ya que las especies analizadas provienen de hábitats contrastantes en condiciones de exposición a la luz. Por ejemplo, las especies provenientes de selva baja caducifolia están expuestas a altos niveles de radiación, comparadas con aquellas de bosque de pino y encino, donde la exposición es menor ya que la luz se filtra a través de los árboles. También se debe considerar la hora del día para la toma de lecturas, ya que la fotosíntesis en *Selaginella* como todas las plantas, está regulada por la hora del día (Soni *et al.*, 2012). Además, se requiere establecer las condiciones que permitan obtener lecturas más estables durante la rehidratación, ya que se puede tener un cierto grado de error debido a la cantidad excesiva de agua dentro de la cámara, que influye en el cálculo de diversos parámetros asociados a la fotosíntesis.

8.3 La especie *Selaginella pallescens*, ¿es una especie tolerante o intolerante a la desecación?

Con excepción de *S. denticulata* y *S. delicatissima*, el resto de las especies que aparecen en la **Tabla 7.4** no se adaptaron a las condiciones de laboratorio. En el caso de las especies intolerantes o con tolerancia indefinida, el efecto fue más drástico, ya que éstas murieron después de uno o dos meses de haber sido colectadas. Por esta razón, fue necesario realizar colectas cada vez que se requería material para los experimentos.

Como muestra la **Tabla 7.4**, los especímenes B-2504 y 5-1107, que fueron colectados en sitios distintos, ambos fueron identificados como *S. pallescens* (**Figura A2**, en **Anexos**). Como indica Abundiz-Bonilla y Tejero-Diez (1990), este tipo de especie puede tener una amplia versatilidad de ambientes al crecer tanto en sitios secos como húmedos, desarrollándose como litófita (que crece en, o sobre, la roca) o terrestre. También crece en lugares expuestos o de sombra, y en varios tipos de suelo, y está asociada a vegetación diversa, que va desde el bosque tropical hasta los matorrales xerófilos (los incisos **a**, **b** y **c** de la **Figura A2** en la sección de **Anexos**; muestran parte de la diversidad que puede tener *S. pallescens*).

Del ensayo de los tratamientos de deshidratación y rehidratación (**Figura 7.2**), se podría clasificar al espécimen 5-1107 como no-TD, lo que lo colocaba como un buen candidato para la comparación con una planta TD con morfología similar (p. ej., *S. lepidophylla*). Al tratarse de la misma especie que la muestra B-2504, se tomó la decisión de realizar con ésta los experimentos de fotosíntesis, por la cercanía al sitio de colecta (**Tabla 7.4**). Pero a diferencia de 5-1107, la oxidación en B-2504 no fue tan evidente en la rehidratación; ésta presentó, además, un plegamiento más ordenado y compacto en la desecación (**Figura A7**, en **Anexos**). Inclusive, se detectó actividad fotosintética 10 h después de la rehidratación (**Figura 7.5**), dando indicios de que fue tejido que sobrevivió al proceso de pérdida de agua.

Curiosamente los especímenes B-2504, provenientes de un ambiente con una mucha mayor disponibilidad de agua, ya que fueron localizadas creciendo cerca de un río, aparentemente presentaron menor oxidación durante la rehidratación que la muestra 5-1107; además, mostraron actividad fotosintética durante la rehidratación. Para explicar este comportamiento se pueden formular varias hipótesis. Una podría adjudicarse a la identificación (realizada a nivel morfológico), la cual podría haber clasificado como una misma especie a organismos diferentes. Otra podría considerar que las diferencias observadas se debieron a que las plantas fueron colectadas y analizadas en épocas del año distintas (p. ej., 5-1107 en verano, y B-2504 en otoño), lo que podría haber modificado la TD en esta especie, la cual es posible que sea adquirida temporalmente para afrontar períodos con menor disponibilidad de agua. Es necesario realizar más estudios al respecto de las muestras clasificadas como *S. pallescens*

para poder definirla como una misma especie, determinar su capacidad como tolerante o intolerante a la desecación, y para realizar análisis filogenéticos, entre otros.

Se determinó que la integridad del RNA se mantiene durante todo el proceso de pérdida de agua (**Tabla 7.5**) incluso en las plantas no-TD (aunque es necesario tomar en cuenta el factor tiempo en la integridad del estado desecado). Sin embargo, éste se degrada una vez que el tejido es rehidratado en las especies no-TD (**Figura 7.10**), aunque el RNA extraído de tejido de *S. pallescens* (espécimen 5-1107) mantuvo la integridad después de la rehidratación, a diferencia de otras especies intolerantes (**Figura 7.10 y Tabla 7.5**). Esto ocurrió a pesar de que esta especie no posee algunos mecanismos necesarios para la TD como la protección contra daño oxidativo (**Figura A10, en Anexos**) ni una respuesta mecánica similar a las plantas TD (**Figura 7.9**). Debido a estas características, se clasificó a *S. pallescens* (espécimen 5-1107) como una especie con tolerancia parcial. Esta clasificación está sujeta a ser verificada mediante estudios adicionales.

8.4 Frondas de *Selaginella* como un primer acercamiento para entender la TD en la planta completa

La comparación entre diferentes especies fue uno de los objetivos del presente trabajo. El cumplimiento de este objetivo representó, sin embargo, superar varios retos, como el establecimiento de un sistema para hacer equiparables los tratamientos aplicados a cada una de las especies. Al estudiar la respuesta a la pérdida de agua y su posterior rehidratación, lo ideal hubiera sido tener un enfoque de lo que sucede en la planta completa. Sin embargo, las plantas empleadas en este trabajo presentaban diferencias contrastantes, no sólo en cuanto a morfología, sino también en el tamaño (p. ej., diámetro de roseta de hasta 25 cm en unas especies contra tan solo de 10 cm en otras), altura de la planta (p. ej., plantas del tipo erecta de hasta 50 cm contra postradas de 5-2 cm de altura), tipo de sustratos (p. ej., suelos ricos en materia orgánica con alta retención de agua, contra roca), etc. (la **Figura A2 en Anexos** muestra diferencias en cuanto a morfología, tipos de vegetación, sustratos). Todos estos factores complicaron el análisis de la planta completa, si el objetivo era estudiarlas con la máxima uniformidad de condiciones posible. Además de que no se disponía de individuos con el mismo tiempo de vida, debido a la falta de correlación entre el tamaño y la edad en

este tipo de plantas (Dr. Klaus Mehltreter, comunicación personal). Otra problemática fue la limitación de material, ya que en la mayoría de los casos se trató de poblaciones aisladas con un número reducido de individuos, de las cuales no se pudo disponer de un número significativo de individuos, ya que al hacerlo se afectarían sus comunidades. Por todo lo mencionado anteriormente se determinó emplear frondas de varios individuos en lugar de las plantas completas.

Los ensayos realizados muestran que las frondas de especies TD no perdieron vitalidad aún después de varios ciclos de deshidratación – rehidratación. Además, conservaron la capacidad mecánica para plegarse o enrollarse en respuesta a la pérdida de agua (**Figura 7.2 y A4**). Y a pesar de que los experimentos de fotosíntesis no fueron concluyentes, se confirmó que el tejido de las plantas tolerantes fue capaz de reactivar la fotosíntesis después de la desecación (**Figuras 7.4 y 7.5**).

Como muestra el trabajo de Pandey *et al.* (2010), las frondas de *S. bryopteris* (una especie TD) presentaron respuesta asociada a la tolerancia a la desecación al incrementar la actividad de enzimas antioxidantes (específicamente superóxido dismutasas, ascorbato peroxidasa y catalasas), la cual fue acompañada de la inducción del metabolismo de carbohidratos (conversión de la sacarosa por actividad de invertasas), de solutos compatibles (acumulación de prolina) y la reactivación de la fotosíntesis durante la rehidratación. Los resultados obtenidos indicaron que el tejido utilizado (en este caso frondas), mantuvo la viabilidad aún después de haberlo separado del resto de la planta y posteriormente haberlo desecado. Además, mantuvo la capacidad de responder ante la pérdida de agua y permaneció aparentemente viable al recuperar los niveles de actividad fotosintética que tenía antes de la desecación. Mencionado lo anterior, podría considerarse que las frondas de *Selaginella* servirán de modelo para discernir la respuesta y mecanismos que se activan en estas plantas durante la desecación y rehidratación, indicando los procesos que ocurren en la planta completa.

La pérdida de agua en frondas de diferentes especies de *Selaginella* presentó un comportamiento muy similar (**Figura 7.8**). Las frondas experimentaron una pérdida de agua

acelerada al inicio de la deshidratación, teniendo una caída drástica del contenido de agua durante las primeras horas del tratamiento siendo más pronunciada en las especies intolerantes.

Comparando con otro estudio (Yobi *et al.*, 2012), la pérdida de agua en frondas de *S. lepidophylla* fue en parte comparable a la reportada en la planta completa, aunque estos autores no utilizaron el mismo parámetro utilizado en este trabajo para expresar la cantidad de agua, en el cual se manejó el contenido relativo de agua (RWC). Sin embargo, la medida puede ser equivalente. En condiciones de laboratorio, la planta completa alcanzó alrededor del 10 % de RWC a las 12 h de haber iniciado el secado (**Figura A8**, en **Anexos**), mientras que en los experimentos realizados en este trabajo, este mismo porcentaje se alcanzó exactamente a las 12.13 h de iniciado el tratamiento. Esto indicó que la velocidad en la pérdida de agua en condiciones de laboratorio entre frondas y la planta completa es equiparable.

8.5 Diversidad génica dentro del género *Selaginella*

Para nuestro estudio se decidió seleccionar las especies *S. lepidophylla* y *S. extensa* por ser plantas TD con morfologías contrastantes. El objetivo de este diseño experimental era determinar mecanismos comunes a la tolerancia no sólo presentes en ambos tipos de plantas, sino también específicos de cada morfología. Se eligió la especie *S. denticulata* para tener la contraparte intolerante a la pérdida de agua, y con ésta determinar cuáles de los mecanismos son respuestas propias a la deshidratación o rehidratación en las plantas TD, que están ausentes en las plantas no-TD. Se seleccionó la especie *S. pallescens* de la muestra 5-1107 porque aparentó tener una tolerancia parcial a la pérdida de agua, ya que el RNA no se degradó cuando el tejido fue rehidratado (**Figura A9**, en **Anexos**) aunque el tejido sufrió cierto grado de oxidación al rehidratarlo (**Figura A10**, en **Anexos**). La selección de estas especies permitió tener un panorama global de los mecanismos y respuesta que sucede en plantas completamente tolerantes, comparando con los que se presentan plantas con una tolerancia parcial o de los cuales carecen las plantas intolerantes a la desecación.

La selección de los contenidos de agua y tiempos de toma de muestra para evaluar expresión génica se realizó considerando como condición control cuando las frondas se encontraban totalmente hidratadas. El primer punto de muestreo durante la etapa de deshidratación se realizó al 70% de contenido de agua, acorde a lo observado en las lecturas de fotosíntesis de la **Figura 7.6**. Este parámetro se seleccionó ya que casi todas las especies mostraron una reducción significativa en su actividad fotosintética al deshidratarse, lo que fue un indicio de que las plantas habían sufrido un efecto fisiológico negativo al alcanzar este nivel de contenido de agua. Se decidió, además, evaluar la expresión global de cada especie al 50 y 10% de contenido de agua: el primero, por tratarse de un punto de efecto intermedio y, el segundo, por su significado biológico, ya que a estos niveles tan bajos no hay suficiente agua para formar una monocapa alrededor de las macromoléculas (Alpert, 2005). Además, se seleccionaron dos tiempos adicionales después de la rehidratación, con el propósito de tener un tiempo temprano (p. ej., a las 2 h), y otro en el que se considera que la planta podría haber alcanzado su funcionamiento normal (p. ej., a las 6 h).

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron entre 120 y casi 200 millones de lecturas para cada especie, conservando alrededor del 90% de ellas después de haber sido procesadas (**Tabla 7.6**). Se eligió el ensamblador Trinity para procesar los transcriptomas ya que es una de las herramientas con mayor desempeño y exactitud en el ensamblaje de la mayoría de los transcritos presentes en una muestra (Honaas *et al.*, 2016).

Algunas de las métricas más aceptadas para determinar si el ensamblado de un transcriptoma es adecuado o no, es tener una alta proporción de las lecturas crudas que mapean contra el ensamblado y una estadística N_{50} alta (Honaas *et al.*, 2016). Como se puede ver en la **Tabla 7.7**, ambos parámetros se cumplieron en cada uno de los ensamblados de las diferentes especies. Comparando con el número de transcritos codificantes de la especie *S. moellendorffii* (especie secuenciada) se observó que los ensamblados de las especies *S. extensa* y *S. pallescens* son lo más cercanos a ese número, mientras que el número de genes de la especie *S. lepidophylla* está por encima de ese valor y el ensamblado de la especie *S. denticulata* resultó en un número casi 2.5 veces más alto de genes. Lo anterior resultó ilógico, aun tratándose de un híbrido entre especies o un evento de duplicación reciente. Tomando

otras estadísticas como la longitud promedio de los transcritos se determinó que el valor más cercano al de la planta secuenciada fue el obtenido para la especie *S. pallescens*. Al realizar análisis adicionales de las lecturas y del ensamblado de *S. denticulata*, se encontró que las librerías de rehidratación podrían tener una posible contaminación, por lo que para motivos de este trabajo tuvieron que ser descartadas (ver explicación detallada en la sección de **Anexos**).

Después de realizar todo el proceso de anotación de los transcriptomas se observó que más del 55% de los genes de las especies *S. extensa* y *S. lepidophylla* tenían algún tipo de anotación, y un poco más del 65% en el caso de *S. pallescens* (**Tabla 7.8**). Analizando la **Tabla 7.8** es evidente que de las especies analizadas en este estudio, *S. pallescens* es la especie que tiene un mayor porcentaje de genes homólogos a *S. moellendorffii*, lo que indica que se trata de la planta más cercana filogenéticamente. Lo cual coincidió con lo descrito por varias filogenias de *Selaginella* basadas en la secuencia del gen *rbcL*, en la que aparecen en clados cercanos *S. moellendorffii* y *S. pallescens*, mientras que las especies *S. lepidophylla* y *S. extensa* por lo general aparecen igualmente alejadas de *S. moellendorffii* pero en clados contiguos una de otra (Zhou *et al.*, 2015; Arrigo *et al.*, 2013; Korall y Kenrick, 2002).

Al realizar comparaciones entre especies en base a sus anotaciones de *Arabidopsis* o *Selaginella* (**Figura 7.14**) se detectó que hay una mayor cantidad de términos compartidos entre las especies con la misma morfología (*S. pallescens* y *S. lepidophylla*) que entre especies que tienen la misma capacidad de tolerar la desecación (*S. lepidophylla* y *S. extensa*), contrario a lo indicado por estudios filogenéticos (Zhou *et al.*, 2015; Korall y Kenrick, 2002).

8.6 Diferencias transcripcionales en la respuesta a la deshidratación y rehidratación entre especies de *Selaginella*

La **Figura 7.18** muestra los perfiles de expresión de los genes que fueron diferencialmente expresados en alguna de las condiciones analizadas. Los patrones de expresión mostraron conjuntos de genes que son regulados en la etapa de deshidratación o en la de rehidratación, otros que se activan en una condición o tiempo específico, o que son comunes a todo el proceso. Además, se detectaron otros con comportamientos muy variables en las especies

TD. Este tipo de regulación de genes, en la cual la actividad de conjuntos de genes ocurrió a tiempos específicos de la deshidratación y rehidratación, podría ser responsable de la tolerancia, a diferencia de la planta con tolerancia parcial, en la cual la mayoría de sus genes permanecieron inducidos o reprimidos en todas las etapas.

En cuanto al número de genes diferencialmente expresados (**Tabla 7.9**), se puede observar que *S. lepidophylla* fue la especie con el mayor número de genes que responden ante la deshidratación y la rehidratación. También es importante resaltar que en las especies TD (específicamente en *S. extensa* y *S. lepidophylla*), se detectó un mayor número de genes inducidos que reprimidos prácticamente en todas las condiciones analizadas, mientras que el efecto contrario se observó en la especie con tolerancia parcial.

Al comparar genes diferencialmente expresados en base a su anotación de *Selaginella* y considerando todos aquellos que fueron significativos en alguna etapa de la deshidratación o tiempo de la rehidratación (**Figura 7.19**), se determinó que *S. extensa* y *S. lepidophylla* comparten un mayor número de genes involucrados en la respuesta a la pérdida de agua y en la rehidratación. El número fue mucho menor al comparar los genes compartidos entre cualquiera de las especies TD con los genes diferencialmente expresados en la planta con tolerancia parcial (es decir, *S. pallescens*). Como consecuencia, se encontraron muy pocos genes comunes de respuesta a la deshidratación o rehidratación en las tres especies estudiadas. Anteriormente, se había definido que después de ser anotados los transcriptomas, las plantas con igual morfología, como *S. lepidophylla* y *S. pallescens*, comparten una mayor similitud en base a sus identificadores de *Arabiposis* o *Selaginella* (**Figura 7.14**). Sin embargo, más adelante se encontró que el número de genes diferencialmente expresados compartidos entre especies fue mucho mayor entre *S. lepidophylla* y *S. extensa*, mostrando que por lo menos hasta ahora un pequeño conjunto de genes relacionados a la TD es compartido entre las especies tolerantes. Considerando que la mayor parte de los genes diferencialmente expresados no son comunes entre las especies generó un indicio de que las respuestas no están siendo mediadas por los mismos genes en el supuesto de tratarse de genes homólogos (aunque en este caso se realizó en base al homólogo en *S. moellendorffii*). Para poder concluir si efectivamente se regulan los mismos genes en las diferentes especies en

respuesta a la deshidratación o rehidratación, será necesario identificar los genes ortólogos entre ellas y determinar si se encuentran diferencialmente expresados en cada una de estas condiciones.

8.7 Explicando la TD en términos de categorías funcionales

Los enriquecimientos funcionales nos muestran un panorama de la TD en este grupo de plantas, aunque es importante mencionar que es incompleto pues se limita a solo aquellos genes diferencialmente expresados con un homólogo en *Arabidopsis*. Las categorías funcionales enriquecidas de los genes inducidos se muestran en las **Figuras 7.20, 7.21 y 7.2**. La especie con un mayor número de categorías enriquecidas fue la especie *S. lepidophylla*, seguida por *S. extensa* y por último *S. pallescens* (se incluyen listas con las subcategorías y sus respectivos conteos en la sección de **Anexos**).

Se identificaron categorías en común y únicas de la etapas de deshidratación y rehidratación entre las especies *S. extensa* y *S. lepidophylla* (ambas TD, con morfología postrada y roseta, respectivamente) (**Figura 7.23**), así como entre *S. lepidophylla* y *S. pallescens* (tolerancia completa y parcial respectivamente; ambas con morfología de roseta) (**Figura 7.24**).

Una diferencia entre las especies TD y las no-TD es el tiempo en el que detectan la condición de estrés y la activación de cascadas de señalización. Mientras que las plantas TD mantienen inducidos genes relacionados a estrés (principalmente del tipo abiótico, por calor, frío y sequía/salinidad, entre otros) durante la deshidratación y rehidratación, la planta con tolerancia parcial sólo lo hizo durante la rehidratación (**Figura 7.22**), lo que sugiere que la planta con tolerancia parcial detecta la condición de estrés de manera tardía. Como muestra el trabajo de Ma *et al.* (2015), la planta de resurrección *M. flabellifolia* involucra hasta 484 proteínas quinasas y 295 factores de transcripción (inducidos y reprimidos) durante la respuesta a la desecación, que involucra la activación de mecanismos de protección dependientes e independientes de ABA. La categoría de señalización sólo fue significativa en las plantas TD, identificando algunas quinasas y un número considerable de genes relacionados a señalización por calcio. La transducción de señales por calcio es estimulada por diferentes tipos de estrés abiótico, en especial por la sequía (Hong-Bo *et al.*, 2008), misma

que no está presente en *S. pallescens* cuando se le somete a estrés por déficit de agua. Dicho patrón sugiere que probablemente no se estén activando mecanismos necesarios para adquirir la tolerancia dependientes de la señalización por calcio.

La **Figura 7.23** muestra que hay un número considerable de categorías compartidas entre las plantas TD potencialmente necesarias para la tolerancia, pero no necesariamente dependientes de las adaptaciones morfológicas o mecánicas que cada especie posee. Como se mencionó en la sección de **Antecedentes**, es de vital importancia la modificación de la pared celular para evitar un daño permanente e irreversible debido a la pérdida del agua (Moore *et al.*, 2008). Solamente la especie *S. lepidophylla* mostró un enriquecimiento en la categoría de pared celular, induciendo principalmente mecanismos de modificación así como la síntesis de precursores y proteínas de la pared celular. Sin embargo, en la categoría de metabolismo secundario, resaltan genes involucrados en la síntesis fenilpropanoides específicamente aquellos relacionados con la biosíntesis de lignina. Con respecto a esto, reportes anteriores en raíces, señalaron que un incremento en la cantidad de lignina aumenta la fuerza mecánica de las paredes celulares ayudando a minimizar la pérdida de agua (Brunner *et al.*, 2015). Una respuesta similar durante la desecación fue observada en la planta de resurrección *Haberlea rhodopensis*, al inducir genes relacionados a la síntesis de lignina con la finalidad de remodelar la arquitectura de la pared celular (Gechev *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la fluidez de la membrana puede estar dada por una remodelación de los lípidos totales. Las tres especies de *Selaginella* mostraron el mismo comportamiento al estar mayormente enriquecida la subcategoría de degradación de lípidos en las últimas fases de la deshidratación y durante la rehidratación. Sin embargo, la comparación con otras subcategorías sugiere que ocurre más bien un recambio en la composición de la membrana, ya que todas las especies también estuvieron enriquecidas en la síntesis y elongación de ácidos grasos. En este sentido, el enriquecimiento de genes catalogados dentro de la categoría asociada a la desaturación de ácidos grasos en *S. lepidophylla*, categoría que está asociada a un incremento en la tolerancia al estrés hídrico (Zhang *et al.*, 2005), representó uno más de los tantos mecanismos que podrían contribuir a la TD en esta especie.

Las plantas de resurrección homoioclorofilas retienen la clorofila al secarse. Sin embargo, a pesar de encontrarse en un estado desecado, la clorofila sigue excitándose por la luz, por lo que el flujo de electrones continúa a través del fotosistema. Esta energía puede ser transferida al oxígeno para formar especies reactivas de oxígeno como singuletes, superóxidos y peróxido de hidrogeno (Pandey *et al.*, 2010). Una de las características más sorprendentes de las plantas de resurrección es su capacidad para evitar el daño oxidativo, teniendo numerosos sistemas de control para prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno, incluyendo antioxidantes. Las plantas *Selaginella* TD presentan en común genes que codifican para enzimas antioxidantes como tiorredoxinas, dismutasas y catalasas, y de glutatión y ascorbato (ver listas de subcategorías en **Anexos**). Sin embargo, los perfiles de expresión son distintos, ya que mientras que en *S. lepidophylla* los encontramos inducidos en el estado desecado y durante la rehidratación, *S. extensa* se limita a la etapa de deshidratación. La especie *S. pallescens* también induce genes involucrados en la síntesis de ascorbato y glutatión, y de tiorredoxinas pero en menor grado. Lo anterior probablemente explique la oxidación observada en el tejido de *S. pallescens* al rehidratarlo (**Figura A10**, en **Anexos**). Al parecer, la inducción de genes de enzimas peroxidadas y catalasas es común entre especies *Selaginella* TD, ya que en *S. bryopteris* se determinó que la presencia y actividad de enzimas peroxidadas y catalasas (específicamente APX y varias isoformas de CAT, respectivamente) aumentó considerablemente en el estado desecado limitando la acumulación excesiva de H₂O₂ (Pandey *et al.*, 2010). La inducción de catalasas como respuesta a la pérdida de agua también ha sido vista en otras plantas de resurrección como *H. rhodopensis*. En esta especie, la aplicación de un inhibidor de catalasas incrementó la sensibilidad a la desecación, demostrando la importancia de este tipo de enzimas en la TD (Gechev *et al.*, 2013). La categoría sobrerrepresentada denominada “Miscellaneous enzyme families” (**Figuras 7.20**, **7.21** y **7.22**) incluye genes que codifican para las enzimas glutatión S-transferasas y peroxidadas, que también son parte de los sistemas antioxidantes en plantas. El enriquecimiento de estos genes se observó en las etapas finales en *S. lepidophylla*, y en la parte media del tratamiento en *S. extensa*. Como parte del metabolismo secundario también se enriqueció la categoría de genes responsables de la síntesis de flavonoides. Se conoce que estos metabolitos tienen actividad antioxidante, y que al ser acumulados pueden mejorar la tolerancia a la sequía y al estrés oxidativo en plantas no-TD (Nakabayashi *et al.*, 2014). Sin

embargo, debe tomarse en cuenta que esta subcategoría también se enriqueció en la especie con tolerancia parcial, lo que sugiere que su rol en la TD pudiera ser menor.

La categoría de proteínas resulto enriquecida durante la deshidratación, la rehidratación o en ambas en todas las especies (**Figura 7.23 y 7.24**). Cabe resaltar un hallazgo interesante en dicha categoría en el caso de la especie tolerante *S. lepidophylla*, ya que aparentemente es capaz de prepararse para inducir la síntesis de proteínas desde la última etapa de deshidratación (10% de contenido de agua) y que este proceso continúa durante la rehidratación, principalmente en lo que se refiere a la síntesis de proteínas asociadas a ribosomas y su biogénesis. Este comportamiento es un indicativo más de los procesos que pudieran contribuir a la viabilidad del tejido. *S. extensa* mostró un comportamiento similar, pero éste se inició desde el 50% de contenido de agua y concluyó a las 2 h de rehidratación. A diferencia de la planta con tolerancia parcial (*S. pallescens*) el principal componente enriquecido en la categoría de proteínas resultó ser el involucrado en la inducción de sistemas de degradación, los cuales se mantuvieron durante todo el tratamiento.

Otras proteínas esenciales para la TD son las del tipo LEA por sus posibles roles en la estabilización de otras proteínas y protección de actividades enzimáticas en condiciones de deficiencia de agua, además de prevenir la agregación de proteínas en la desecación (van den Dries *et al.*, 2011). Estas proteínas están incluidas en la categoría de desarrollo, y resultaron comúnmente enriquecidas en las especies con tolerancia completa (*S. lepidophylla*) y parcial (*S. pallescens*), respectivamente, mientras que el número de genes codificantes para proteínas del tipo LEA fue mayor en la especie TD que en la de tolerancia parcial. Como mencionan Dinakar y Bartels (2013), la expresión de transcritos codificantes para proteínas LEA es una respuesta común entre especies tolerantes e intolerantes a la desecación, y que la mayor diferencia reside en la abundancia de dichos transcritos. Por esta razón será necesario comparar los niveles de expresión de dichos genes para poder determinar su influencia en la adquisición de la TD. A pesar de que los genes no resultaron enriquecidos en la especie *S. extensa* (planta TD), no debe descartarse que dichas proteínas participen en la adquisición de la tolerancia a la desecación esta especie. Por ello, es necesario realizar más análisis para

confirmar la presencia de estas proteínas en la especie *S. extensa* y en general para definir su rol en el género *Selaginella*.

La fijación de carbono por medio de la fotosíntesis se reduce durante el estrés por déficit de agua, y esto se debe principalmente a una disminución en la disponibilidad de CO₂ para la enzima ribulosa-1,5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa causada por la limitación en la difusión de CO₂ a través de los estomas cuando estos se cierran para evitar la transpiración excesiva (Dinakar *et al.*, 2012). Los ensayos realizados mostraron que la fotosíntesis se detiene al poco tiempo de haber iniciado el tratamiento de deshidratación (**Figuras 7.4 y 7.6**), a pesar de que este tipo de plantas no poseen mecanismos eficientes para regular la apertura y cierre de sus estomas, por lo que tienen tasas de transpiración altas y baja eficiencia en el uso del agua (Soni *et al.*, 2012). Los mecanismos responsables de inactivar la fotosíntesis en las plantas de resurrección suelen variar dependiendo de la especie (Dinakar *et al.*, 2012). En relación con lo antes mencionado, era de esperar que genes relacionados a la fotosíntesis fueran reprimidos ante la pérdida de agua. Sin embargo, en las plantas *Selaginella* TD estudiadas hay una inducción de genes involucrados en fotosíntesis (**Figuras 7.20 y 7.21**), mientras que la especie con tolerancia parcial mostró un comportamiento concordante con esta tendencia, al reprimir genes relacionados a la fotosíntesis conforme fue disminuyendo el contenido de agua (**Figura A13**, en **Anexos**). Cabe mencionar que en el caso de *S. lepidophylla*, la inducción se presentó principalmente al alcanzar un contenido de agua del 10%, por lo que es posible hipotetizar que en este punto dicha planta acumula genes de fotosíntesis para una reactivación más rápida de este proceso cuando la planta sea rehidratada. Los genes de fotosíntesis en *S. extensa* se inducen al alcanzar un contenido de agua del 50%. Curiosamente, este comportamiento no fue acorde a las lecturas de fotosíntesis obtenidas (**Figura 7.6**), ya que en estos contenidos de agua incluso se tenían valores negativos de actividad fotosintética. Autores como Dinakar y Bartels (2013) mencionan que algunos de los transcritos más abundantes en el estado hidratado y rehidratado de las plantas de resurrección codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis y metabolismo de carbohidratos, y que los transcritos relacionados a la fotosíntesis decrecen gradualmente durante la deshidratación. Aunque la represión génica de este proceso no parece ser un comportamiento común entre las plantas de resurrección, ya que estudios a nivel de proteínas en la especie *Sporobolus stapfianus*

muestran que genes codificantes de enzimas del ciclo de Calvin incrementan su abundancia en respuesta a la deshidratación (Oliver *et al.*, 2011). Este hallazgo coincidió con lo observado en las especies de *Selaginella* TD, en las cuales fueron precisamente este tipo de genes los que mostraron mayor inducción.

Otra de las categorías enriquecidas en las plantas TD fue la de transporte, la cual también esta enriquecida en la planta que mostró tolerancia parcial. Sin embargo, revisando las subcategorías se encontró una clasificada como “Major Intrinsic Proteins” la cual incluye acuaporinas, las cuales están relacionadas con la TD como se mencionó anteriormente. Dicho resultado coincide con estudios en los que se ha demostrado que la sobreexpresión de este tipo de genes aumenta la tolerancia a sequía (Zhou *et al.*, 2012).

Los carbohidratos juegan un rol muy importante en la TD, principalmente en el ajuste osmótico y la vitrificación del citoplasma. Las especies tolerantes *S. lepidophylla* y *S. extensa* mostraron enriquecimiento en genes relacionados al metabolismo de trehalosa y rafinosa respectivamente, que se ha reportado que son unos de los principales azúcares presentes en el estado desecado de plantas de resurrección (Dinakar y Bartels, 2013). A pesar de que existen estudios que muestran que la acumulación de trehalosa incrementa la tolerancia a la sequía (Ashraf, 2010), su papel en la TD en plantas *Selaginella* aún es discutible, ya que se ha mostrado que plantas intolerantes también acumulan este tipo de azúcar en respuesta a la deshidratación incluso a niveles mayores que las plantas tolerantes (Yobi *et al.*, 2012).

Anteriormente se recalcó que el ABA es la principal hormona involucrada en la respuesta a la pérdida de agua. En *Selaginella lepidophylla* se sabe que hay una respuesta a la deshidratación dependiente de ABA, ya que ésta es capaz de inducir factores de transcripción bZIP que se unen a elementos reguladores del tipo ABRE (Iturriaga *et al.*, 2006), además de que genes que responden a la deshidratación en *Selaginella tamariscina* (p. ej., *ELIP*, *OST1* y varias *LEA*) también se inducen con la adición de ABA (Liu *et al.*, 2008). En las especies *S. pallescens* y *S. lepidophylla*, parte la respuesta a la pérdida de agua parece estar mediada por ABA, lo que indica que estas plantas utilizan una estrategia similar a la empleada por las plantas vasculares complejas. Curiosamente en la especie TD *S. extensa*, no se detectó ningún

gen relacionado con el ABA, a pesar de que en ésta también se observó un enriquecimiento en la categoría de metabolismo de hormonas. Sin embargo, no debe descartarse la participación de ABA en la adquisición de la tolerancia en *S. extensa* sin haber realizado más estudios.

En las **Figuras 7.20, 7.21 y 7.22** se puede observar que una de las categorías más enriquecidas es la correspondiente a RNA, siendo el principal componente los factores de transcripción (FT). Entre los principales factores de transcripción que se expresaron en las plantas TD y que han sido probados para el mejoramiento de la tolerancia al estrés en cultivos de interés agronómico (López-Arredondo *et al.*, 2015) estuvieron FT del tipo AP2/EREBP, MYB, bZIP, “Zinc finger”, por mencionar algunos. La mayoría de éstos también están presentes en la especie *S. pallescens*, además de muchos otros. Hasta el momento no es posible concluir nada sobre la diferencia en la TD entre las especies de *Selaginella* en términos de la participación de la actividad reguladora de los FT. Para ello será necesario analizar las condiciones o tiempos en los que se activan cada uno de ellos así como la presencia de dominios de proteína a nivel de secuencia y su relación con la TD. Además, deberán realizarse estudios más avanzados que impliquen analizar los elementos reguladores de los genes sobre los que actúan dichos FT presentes en las plantas TD, y cuáles de ellos están ausentes en las especies no-TD. Lo anterior tendrá la finalidad de determinar el rol de este tipo de proteínas en la tolerancia al estrés hídrico.

Las especies TD a diferencia de la que posee tolerancia parcial, estuvieron enriquecidas en el metabolismo de aminoácido. Sin embargo, no se detectaron subcategorías relacionadas con prolina pero si con GABA (“ γ -aminobutyric acid”), un aminoácido no proteico que es capaz de acumularse en respuesta a estrés biótico y abiótico, y que en la sequía tiene la función de regular la apertura del estoma para prevenir la pérdida de agua (Mekonnen *et al.*, 2016). La acumulación de GABA en respuesta a la pérdida de agua se ha detectado a nivel metabólico en otras plantas de resurrección como *H. rhodopensis*, en la que se propone que actúa como un inhibidor del crecimiento (específicamente la elongación celular) durante la deshidratación (Gechev *et al.*, 2013).

IX. CONCLUSIONES

- El género *Selaginella* es un modelo de estudio apropiado para entender la tolerancia a la desecación, por la amplia diversidad de mecanismos que han desarrollado sus diferentes miembros como parte de su adaptación a ambientes contrastantes en la disponibilidad de agua. Además, del potencial para el descubrimiento de nuevas especies TD.
- Se comprobó que las frondas de especies de *Selaginella* TD se mantienen viables después de la desecación y presentan la misma respuesta de expresión génica vista en organismos completos de otras plantas de resurrección. Además mantuvieron la capacidad mecánica de plegarse en respuesta a la pérdida de agua después de varios ciclos de deshidratación y rehidratación.
- La velocidad de la pérdida de agua en especies TD con morfología de roseta es más lenta comparada con las no-TD, lo que probablemente se traduce en un mayor tiempo para la inducción de mecanismos de protección celular para evitar o limitar el daño producido por déficit de agua.
- Se definió a la especie *S. pallescens* de la muestra 5-1107 como una planta con tolerancia parcial a la pérdida de agua, al mantener la integridad del RNA en la rehidratación después de un estado de desecación, pero al carecer de los mecanismos antioxidantes suficientes para evitar la oxidación durante la rehidratación y de las adaptaciones mecánicas ante la pérdida de agua, que caracterizan a las especies TD.
- Los patrones de expresión de genes diferencialmente expresados en las plantas TD presentan un comportamiento más variable en respuesta a los diferentes contenidos de agua y tiempos de rehidratación. Este comportamiento contrastó con el patrón observado en la planta con tolerancia parcial, en la cual los genes fueron generalmente inducidos o reprimidos sin importar la condición. Además de que la deshidratación y rehidratación en las especies TD promovió la inducción de genes, contrario a lo que sucedió en la especie con tolerancia parcial, en la que se observó una mayor cantidad de genes reprimidos.
- Las plantas TD indujeron la expresión de genes relacionados a estrés desde el inicio de la pérdida de agua y durante la rehidratación, mientras que la planta con tolerancia parcial lo hizo hasta la rehidratación. Este comportamiento puede explicar algunas de

las diferencias entre plantas tolerantes e intolerantes a la desecación, pues en la especie parcialmente tolerante, la detección del estrés ocurrió cuando probablemente el daño ya estaba hecho.

- La actividad fotosintética en plantas TD se detuvo a tiempos tempranos de la pérdida de agua, no así la expresión de genes relacionada a este proceso. Este patrón indicó posiblemente que estas plantas acumulan transcritos durante la deshidratación con la finalidad de activar más rápidamente este proceso esencial en la rehidratación.
- Existen algunos mecanismos comunes en plantas tolerantes con morfologías distintas que son potencialmente necesarios para la TD como el metabolismo secundario (específicamente síntesis de fenilpropanoides), sistemas antioxidantes (p. ej., enzimas del tipo tiorredoxinas, dismutasas, catalasas, glutatión S-transferasas y peroxidasas), señalización por calcio, metabolismo de aminoácidos (sobre todo la síntesis de GABA) y proteínas de transporte (p. ej., algunas acuaporinas). Sin embargo, las etapas en las que se expresaron estos genes fueron distintas.
- Se identificaron posibles mecanismos de tolerancia únicos asociados para cada morfología, como la desaturación de lípidos de membrana en *S. lepidophylla*, y el metabolismo de azúcares, favorecido a la síntesis de rafinosa, en *S. extensa*.
- Se determinó que hay mecanismos generales a la respuesta a estrés por déficit de agua en plantas TD y no-TD (*S. lepidophylla* y *S. pallescens* respectivamente) como el recambio en la composición de la membrana, la inducción de factores de transcripción involucrados en la adquisición de la tolerancia vegetativa y en semillas, la regulación por ABA y síntesis de proteínas del tipo LEA.

X. PERSPECTIVAS

- Realizar más estudios sobre *S. pallescens*; definir si se trata de una o más especies, determinar su tolerancia, relacionar su capacidad para tolerar la sequía en base a su adaptación a diferentes tipos de ambientes o estaciones del año.
- Realizar la anotación y análisis de expresión diferencial y enriquecimientos funcionales de la especie *S. denticulata* para su comparación con las demás especies de *Selaginella* y sus transcriptomas.
- Identificar los genes ortólogos entre las especies secuenciadas.
- Comparar la expresión de genes involucrados en la TD entre las diferentes especies utilizando sus ortólogos.
- Realizar análisis filogenéticos de los especímenes colectados.
- Identificar rutas metabólicas enriquecidas y cuantificar metabolitos relacionados a la tolerancia en las especies TD, y comparar con las especies no-TD.

XI. REFERENCIAS

- Abundiz-Bonilla, L. A. M. y Tejero-Diez, J. D. El género *Selaginella* Pal.-Beauv. (Selaginellaceae, Lycopodiophyta) en el oeste del estado de México, México. *Acta Botánica Mexicana* **11**, 23-47 (1990).
- Alpert, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 685–95 (2005).
- Arrigo, N. *et al.* A total evidence approach to understanding phylogenetic relationships and ecological diversity in *Selaginella* subg. *Tetragonostachys*. *Am. J. Bot.* **100**, 1672–1682 (2013).
- Ashraf, M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnol. Adv.* **28**, 169–183 (2010).
- Banks, J. A. *et al.* The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* **332**, 960–3 (2011).
- Banks, J. A. *Selaginella* and 400 million years of separation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 223–238 (2009).
- Bartels, D., y Hussain, S. S. Resurrection plants: physiology and molecular biology. En U. Lüttge, E. Beck, y D. Bartels (eds.), *Ecological Studies: Desiccation Tolerance in Plants*, pp. 339–364. Heidelberg: Springer (2011).
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M. y Sperisen, C. How tree roots respond to drought. *Front. Plant Sci.* **6**, 547 (2015).
- CONABIO. Catálogo taxonómico de especies de México. Volumen 1. En *Capital Natural de México*. CONABIO, Cd. de México, 2008.

Costa, M. C. D. *et al.* Key genes involved in desiccation tolerance and dormancy across life forms. *Plant Sci.* (2016). doi:10.1016/j.plantsci.2016.02.001

Dai, A. Drought under global warming: A review. *Wiley Interdiscip. Rev. Clim. Chang.* **2**, 45–65 (2011).

Dinakar, C. y Bartels, D. Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Front. Plant Sci.* **4**, 482 (2013).

Dinakar, C., Djilianov, D. y Bartels, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Sci.* **182**, 29–41 (2012).

Fang, Y. y Xiong, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 673–689 (2015).

Farrant, J. M. y Moore, J. P. Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 340–345 (2011).

Farrant, J. M., Brandt, W. y Lindsey, G. G. An Overview of Mechanisms of Desiccation Tolerance in Selected Angiosperm Resurrection Plants. *Plant Stress* **1**, 72–84 (2007).

Gechev, T. S. *et al.* Molecular mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection glacial relic *Haberlea rhodopensis*. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 689–709 (2013).

Griffiths, C. A., Gaff, D. F. & Neale, A. D. Drying without senescence in resurrection plants. *Front. Plant Sci.* **5**, 36 (2014).

Honaas, L. a. *et al.* Selecting Superior De Novo Transcriptome Assemblies: Lessons Learned by Leveraging the Best Plant Genome. *PLoS One* **11**, e0146062 (2016).

Hong-Bo, S., Li-Ye, C., Ming-An, S., Shi-Qing, L. y Ji-Cheng, Y. Bioengineering plant resistance to abiotic stresses by the global calcium signal system. *Biotechnol. Adv.* **26**, 503–510 (2008).

Hu, H. y Xiong, L. Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 715–741 (2014).

Illing, N., Denby, K. J., Collett, H., Shen, A. y Farrant, J. M. The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 771–787 (2005).

Iturriaga, G., Gaff, D. F. y Zentella, R. New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Aust. J. Bot.* **48**, 153 (2000).

Korall, P. & Kenrick, P. Phylogenetic relationships in Selaginellaceae based on rbcL sequences. *Am. J. Bot.* **89**, 506–517 (2002).

Lawlor, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *J. Exp. Bot.* **64**, 83–108 (2013).

Liu, M.-S., Chien, C.-T. & Lin, T.-P. Constitutive components and induced gene expression are involved in the desiccation tolerance of *Selaginella tamariscina*. *Plant Cell Physiol.* **49**, 653–663 (2008).

López-Arredondo, D., González-Morales, S. I., Bello-Bello, E., Alejo-Jacuinde, G. y Herrera, L. Engineering food crops to grow in harsh environments. *F1000Research* **4**, (2015).

Ma, C. *et al.* Transcriptomic analysis reveals numerous diverse protein kinases and transcription factors involved in desiccation tolerance in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Hortic. Res.* **2**, (2015).

McKersie, B. Planning for food security in a changing climate. *J. Exp. Bot.* **66**, 3435–50 (2015).

Mekonnen, D. W., Flügge, U.-I. y Ludewig, F. Gamma-aminobutyric acid depletion affects stomata closure and drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **245**, 25–34 (2016).

Mir, R. R., Zaman-Allah, M., Sreenivasulu, N., Trethowan, R. y Varshney, R. K. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. *Theor. Appl. Genet.* **125**, 625–45 (2012).

Mitra, J., Xu, G., Wang, B., Li, M. y Deng, X. Understanding desiccation tolerance using the resurrection plant *Boea hygrometrica* as a model system. *Front. Plant Sci.* **4**, 446 (2013).

Moore, J. P., Vicré-Gibouin, M., Farrant, J. M. y Driouich, A. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiol. Plant.* **134**, 237–45 (2008).

Nakabayashi, R. *et al.* Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.* **77**, 367–79 (2014).

Oliver, M. J., Tuba, Z. y Mishler, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecol.* **151**, 85–100 (2000).

Oliver, M.J. Lessons on dehydration tolerance from desiccation-tolerant plants. En M. Jenks and A.J. Wood (eds), *Plant Desiccation Tolerance*, pp. 11–42. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK (2007).

Oliver, M. J. *et al.* Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, *Sporobolus stapfianus*, in response to dehydration. *Phytochemistry* **72**, 1273–1284 (2011).

Orlowsky, B. y Seneviratne, S. I. Elusive drought: uncertainty in observed trends and short- and long-term CMIP5 projections. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* (2013).

Pandey, V. *et al.* Desiccation-induced physiological and biochemical changes in resurrection plant, *Selaginella bryopteris*. *J. Plant Physiol.* **167**, 1351–1359 (2010).

Pampurova, S. y Van Dijck, P. The desiccation tolerant secrets of *Selaginella lepidophylla*: what we have learned so far? *Plant Physiol. Biochem.* **80**, 285–90 (2014).

Proctor, M. C. F., y V. C. Pence. Vegetative Tissues: Bryophytes, vascular resurrection plants, and vegetative propogules. En M. Black and H.W. Pritchard (eds.), *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*, pp. 207–237. CABI Publishing, Wallingford, Oxon (2002).

Rafsanjani, A., Brulé, V., Western, T. L. y Pasini, D. Hydro-responsive curling of the resurrection plant *Selaginella lepidophylla*. *Sci. Rep.* **5**, 8064 (2015).

Rodriguez, M. C. S. *et al.* Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* **63**, 212–228 (2010).

Soni, D. K. *et al.* Photosynthetic characteristics and the response of stomata to environmental determinants and ABA in *Selaginella bryopteris*, a resurrection spike moss species. *Plant Sci.* **191**, 43–52 (2012).

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. y Mittler, R. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol.* **203**, 32–43 (2014).

Toldi, O., Tuba, Z. y Scott, P. Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Sci.* **176**, 187–199 (2009).

van den Dries, N., Facchinelli, F., Giarola, V., Phillips, J. R. & Bartels, D. Comparative analysis of LEA-like 11-24 gene expression and regulation in related plant species within the Linderniaceae that differ in desiccation tolerance. *New Phytol.* **190**, 75–88 (2011).

Walters, C., Hill, L. M. y Wheeler, L. J. Dying while Dry: Kinetics and Mechanisms of Deterioration in Desiccated Organisms. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 751–8 (2005).

Wilhite, D. A., y Buchanan-Smith, M. Drought as hazard: Understanding the natural and social context. En D. A. Wilhite (ed.), *Drought and water crises: science, technology, and management issues*, pp. 3 – 29. CRC Press (2005).

Yobi, A. *et al.* Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *Plant J.* **72**, 983–999 (2012).

Zhang, M. *et al.* Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *Plant J.* **44**, 361–71 (2005).

Zhou, S. *et al.* Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS One* **7**, e52439 (2012).

Zhou, X.-M. *et al.* A large-scale phylogeny of the lycophyte genus *Selaginella* (Selaginellaceae: Lycopodiopsida) based on plastid and nuclear loci. *Cladistics* 1–30 (2015).

Zhu, Y. *et al.* Global Transcriptome Analysis Reveals Acclimation-Primed Processes Involved in the Acquisition of Desiccation Tolerance in *Boea hygrometrica*. *Plant Cell Physiol.* **56**, 1429–1441 (2015).

XI. ANEXOS



FIGURA A1. Sitios de colecta donde se encontraron plantas del género *Selaginella*.



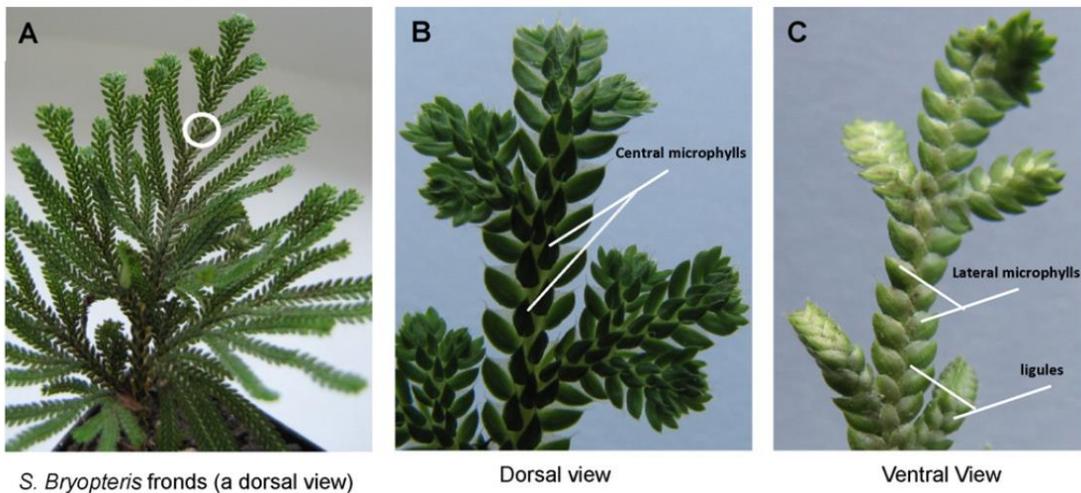
FIGURA A2. Plantas en su hábitat natural. Especímenes de las muestras B-2504 (A), 1a2-1906 (B) y 5-1107 (C) identificados como *S. pallescens*. Especímenes 10-1307 (D), 3a1-2106 (E) y 11-1407 (F) identificados como *S. lepidophylla*.



FIGURA A2. Plantas en su hábitat natural (continuación). Especímenes de las muestras A-2504 (G) y 4-1107 (H) identificados como *S. delicatissima*; 14-1407 (I) y 16-1507 (L) identificados como *S. basipilosa*; 12-1407 (J) y 1a1-1906 (K) identificados como *S. extensa* y *S. sartorii* respectivamente.



FIGURA A2. Plantas en su hábitat natural (continuación). Especímenes de las muestras 18-1607 (M), 7-1107 (N) y 9-1307 (P) identificadas como *S. martensii*, *S. stellata* y *Selaginella* sp. respectivamente. La especie *S. denticulata* creciendo en invernadero del jardín botánico del IB-UNAM.



S. Bryopteris fronds (a dorsal view)

Dorsal view

Ventral View

FIGURA A3. Frondas de la especie *S. bryopteris*. Extraída de Soni *et al.* (2012)

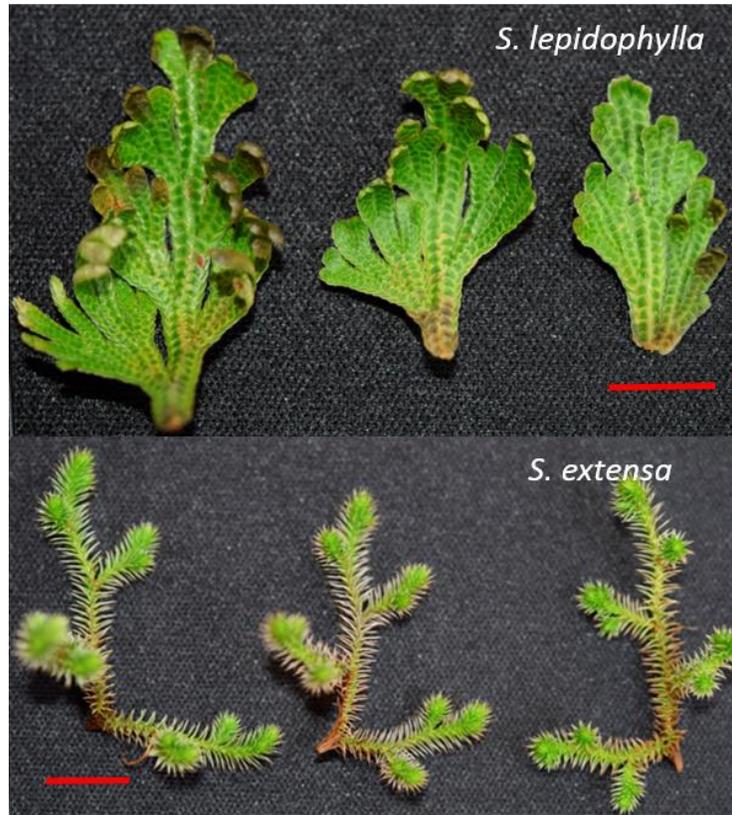


FIGURA A4. Frondas en su cuarto ciclo de rehidratación a los 8 meses de haber sido colectadas.

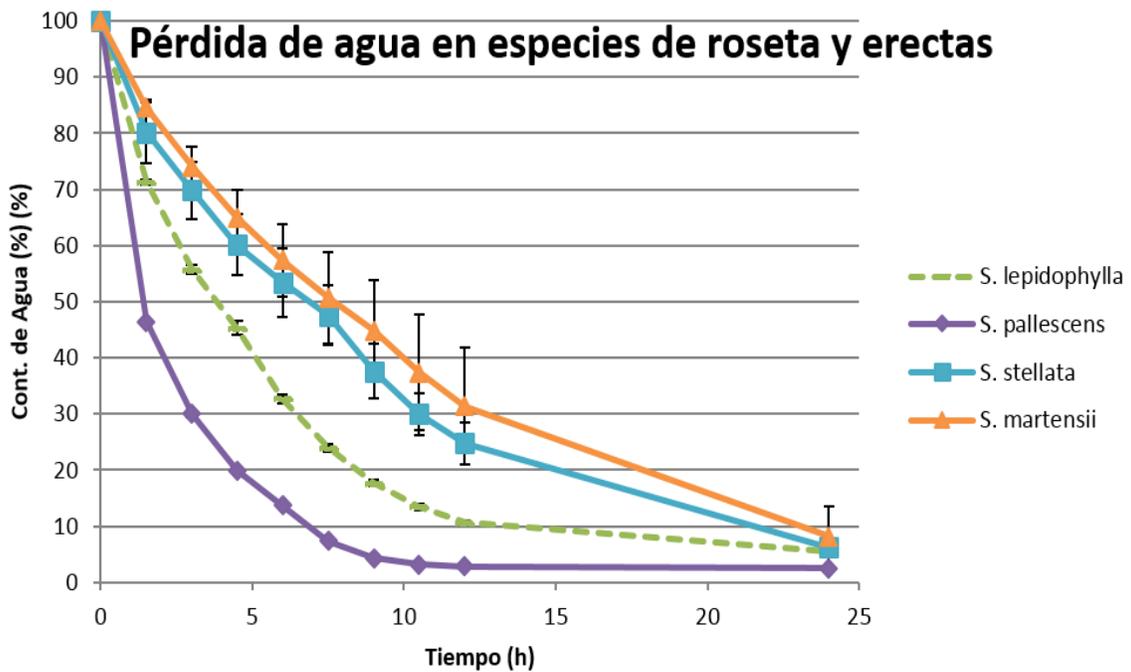


FIGURA A5. Pérdida de agua en frondas de plantas *Selaginella* con diferentes morfologías.

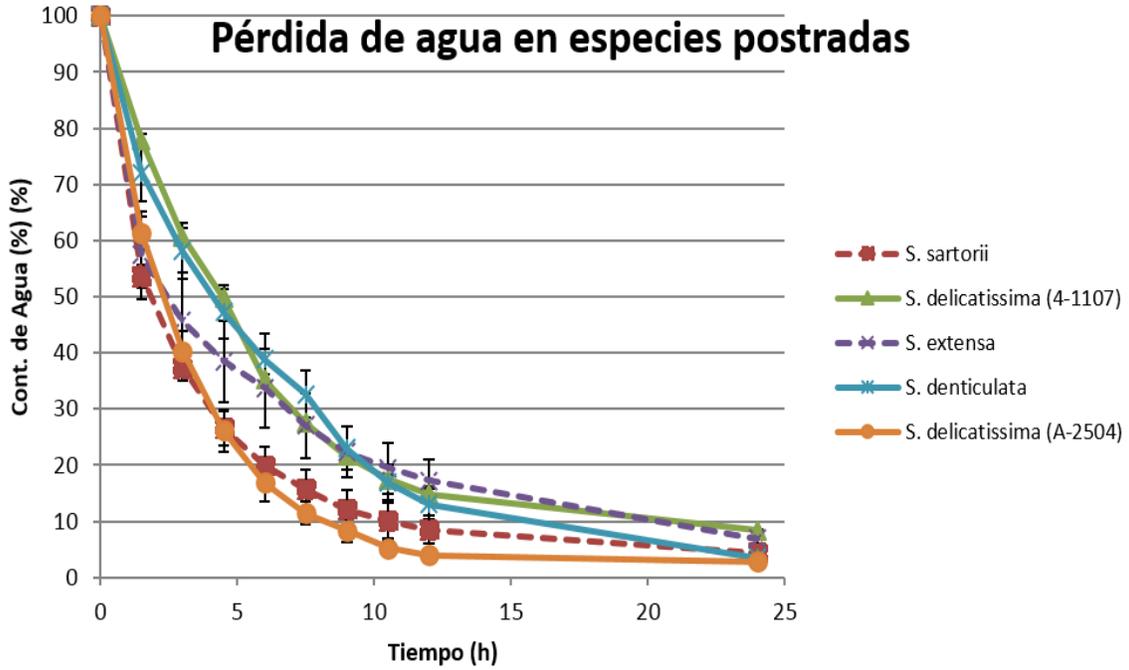


FIGURA A5. Pérdida de agua en frondas de plantas *Selaginella* con diferentes morfologías (continuación).

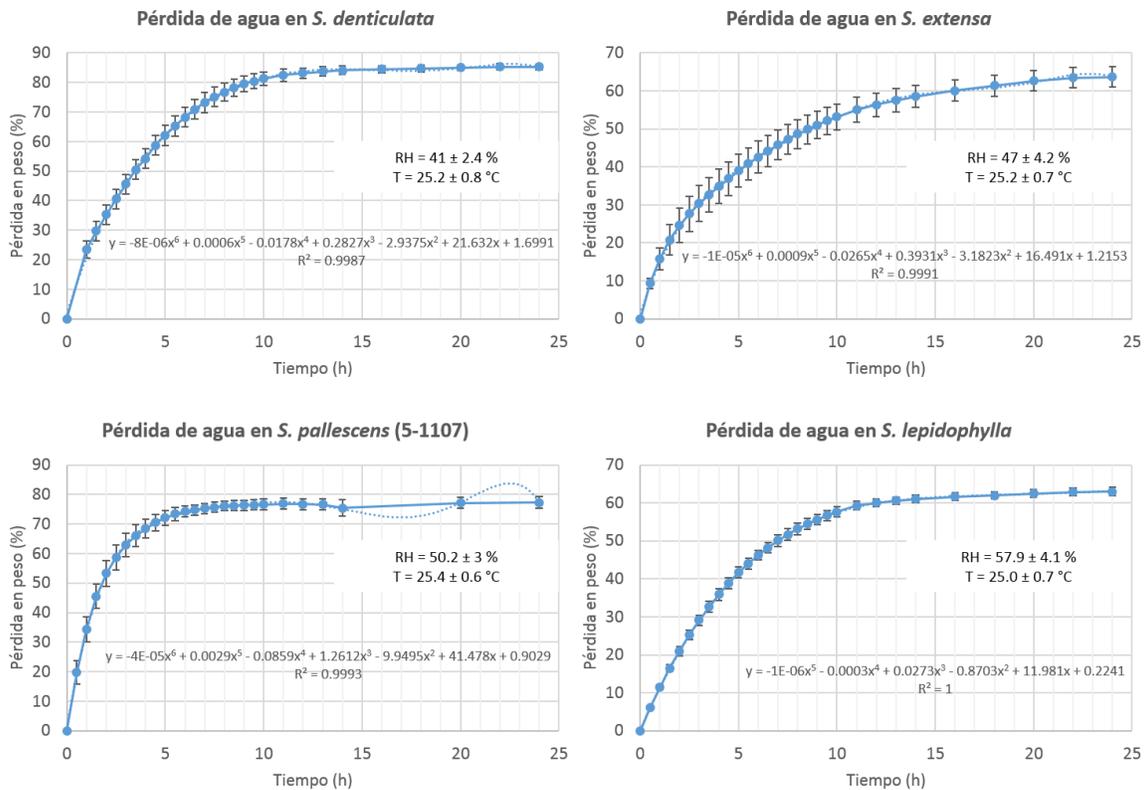


FIGURA A6. Pérdida con respecto al peso fresco durante la deshidratación.



FIGURA A7. Frondas de la planta *S. pallescens* utilizada para las lecturas de fotosíntesis. Frondas en la planta (A), en estado desecado (B) y rehidratadas (C).

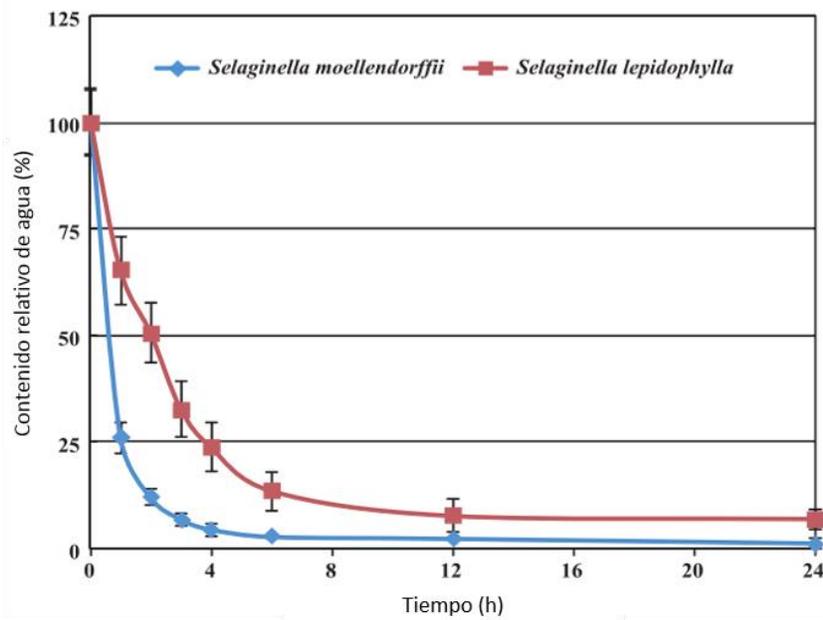


FIGURA A8. Pérdida de agua entre especies que difieren en la TD. Se observa la pérdida de agua en plantas completas de la especie tolerante *S. lepidophylla* comparada con la especie intolerante *S. moellendorffii*. Modificada de Yobi et al., (2012).

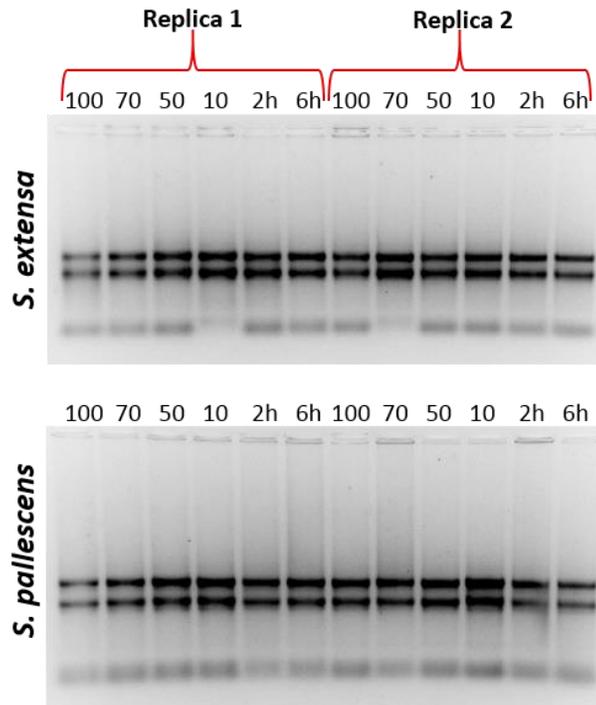


FIGURA A9. RNAs extraídos de *S. extensa* y *S. pallescens* (5-1107). El RNA de la especie *S. pallescens* no muestra signos de degradación en la rehidratación a pesar de no tratarse de una planta con TD completa.

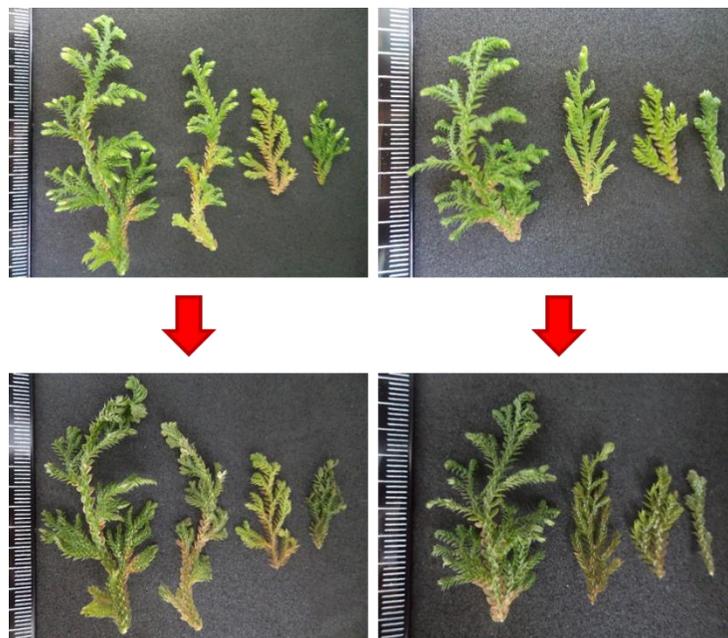


FIGURA A10. Frondas de *S. pallescens* (5-1107) a las 2h de la rehidratación. Aspecto de las frondas de *S. pallescens* antes de deshidratarse (superior), y oscurecimiento del tejido al rehidratarse (inferior).

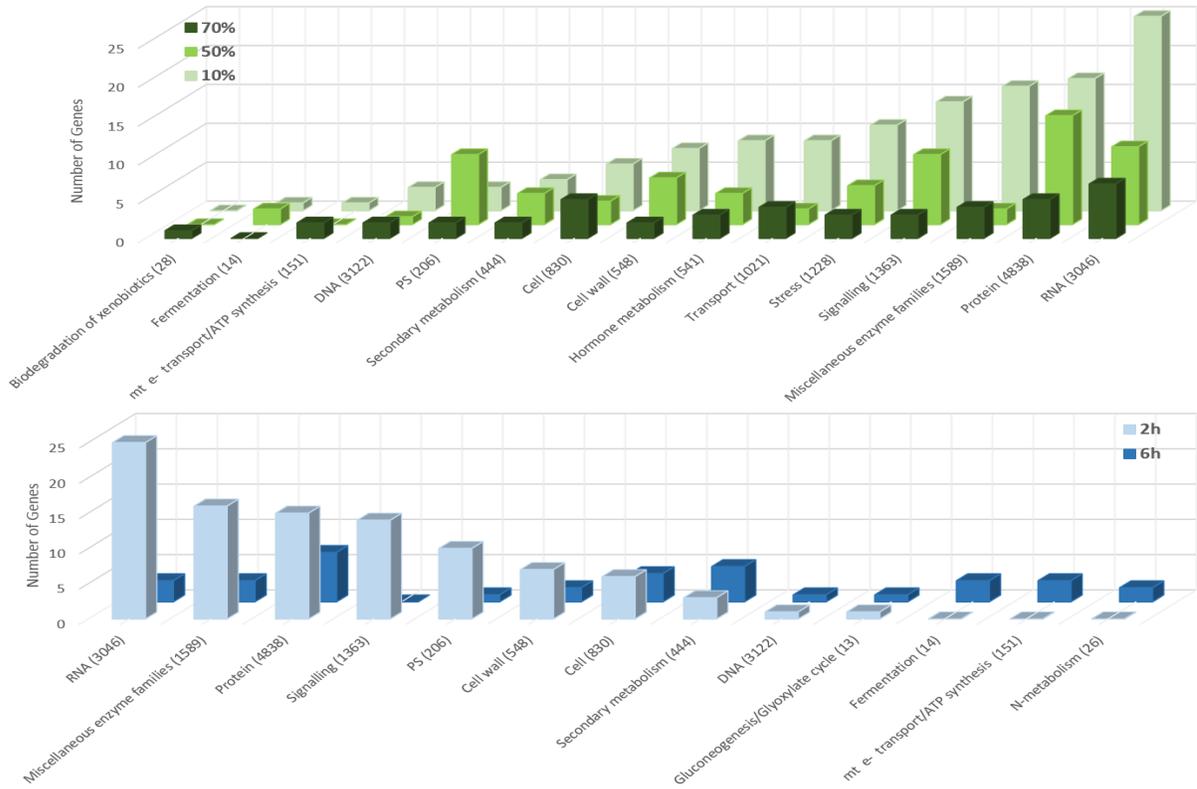


FIGURA A11. Categorías funcionales enriquecidas reprimidas en *S. lepidophylla*.

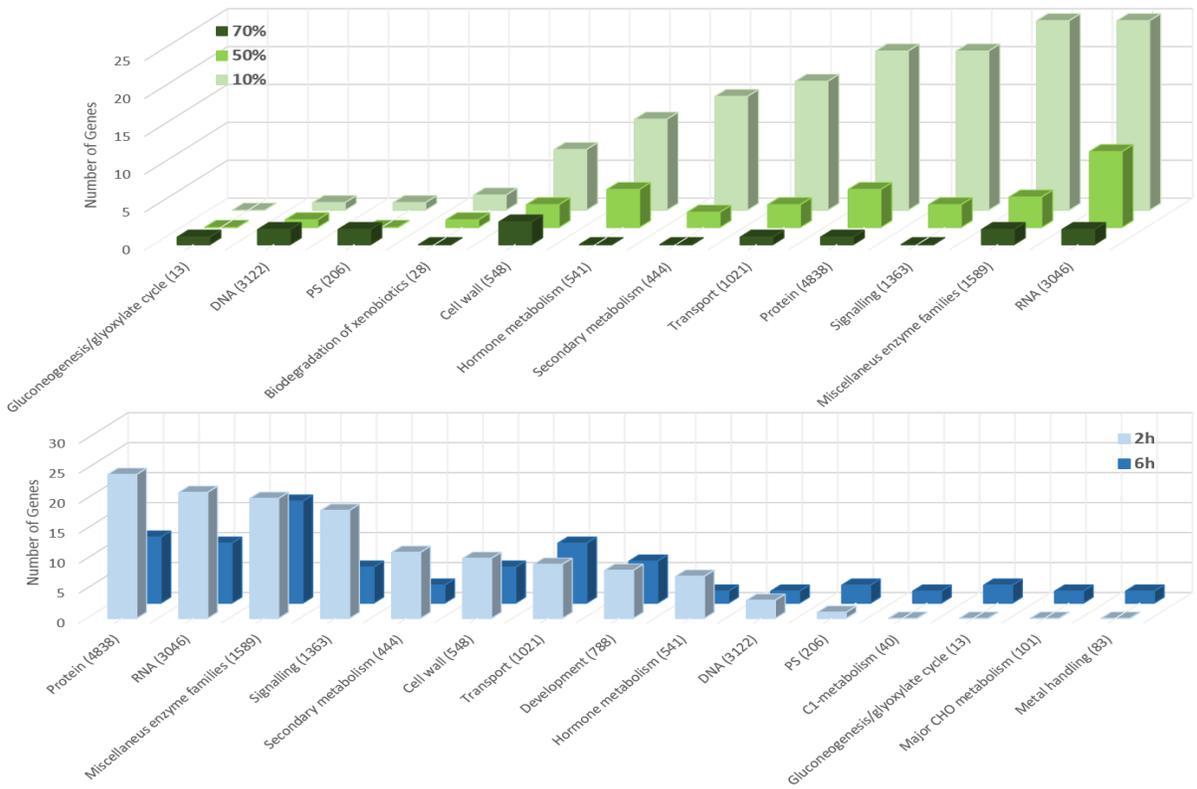


FIGURA A12. Categorías funcionales enriquecidas reprimidas en *S. extensa*.

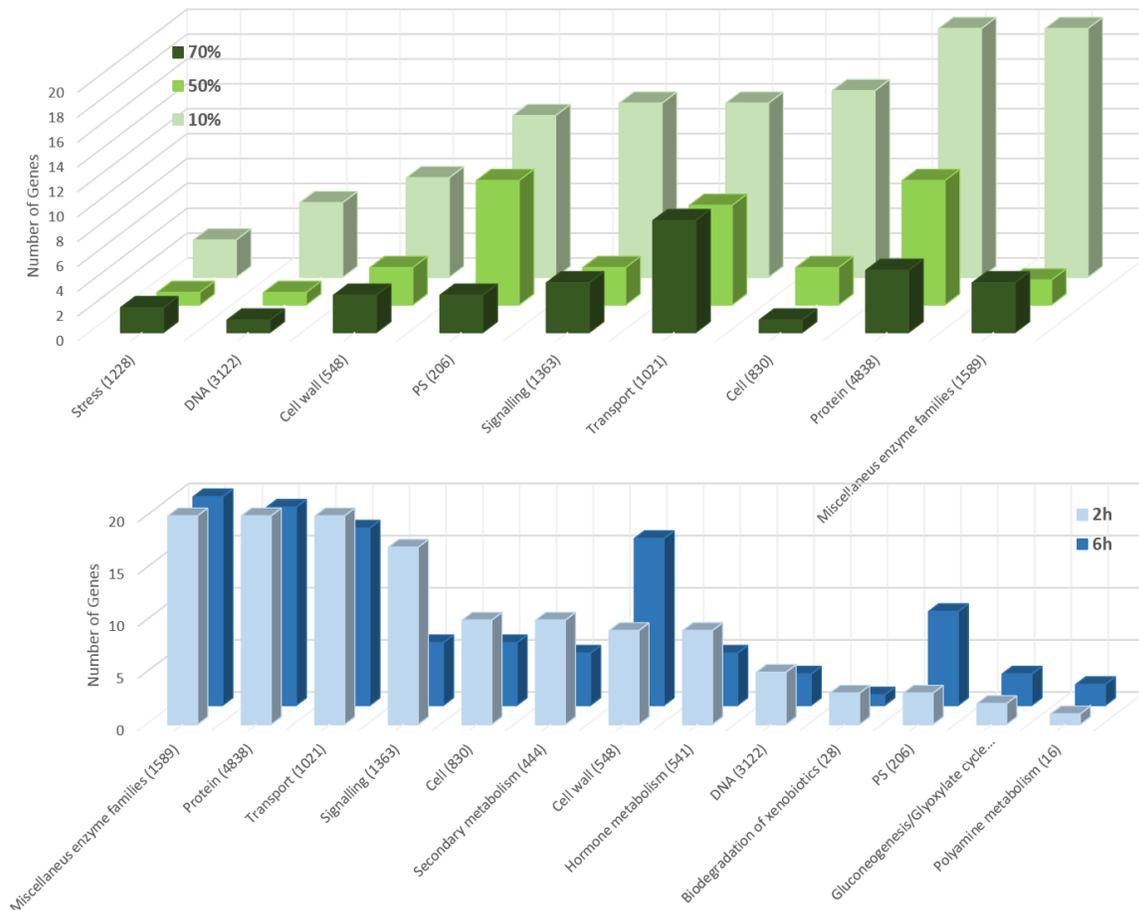


FIGURA A13. Categorías funcionales enriquecidas reprimidas en *S. pallescens*.

ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL TRANSCRIPTOMA DE *S. denticulata*

La especie *S. denticulata* (*S.dent*), una planta intolerante a la pérdida de agua, mantiene íntegro su RNA durante todo el proceso de pérdida de agua, sin embargo, cuando el tejido es rehidratado el RNA comienza a degradarse como puede observarse en la **Figura 7.10**. La degradación del RNA en la rehidratación es un resultado esperado considerando que esta especie no tolera la pérdida de agua, una vez rehidratada hay una inmediata oxidación del tejido, si el organismo está senesciendo (si no es que ya murió) no es de sorprender que su RNA se esté degradando. Por lo que se decidió hacer también la secuenciación de estos tiempos a pesar de la implicación de generar librerías a partir de muestras degradadas.

El ensamblado se hizo con Trinity utilizando todas las condiciones (100, 70, 50 y 10%, 2h y 6h) utilizando los parámetros por default de la versión **Trinity v2.1.1** y las estadísticas que se obtuvieron de esta y las demás especies se muestran en la **Tabla 7.7**.

Con excepción de S.dent, las demás especies tienen un número de genes y estadísticas razonables. Por su exagerado número de genes/transcritos de S.dent, se decidió hacer nuevamente un ensamblado considerando solo las librerías generadas con RNAs integros (100, 70, 50 y 10%) tomando en cuenta que entre ellas sumaban un total de más de 100 000 000 de lecturas, suficientes para tener una buena cobertura de todos los genes que se están expresando. De igual manera, se realizó otro ensamblado solo con las bibliotecas de rehidratación (2h y 6h), aunque estas tenían una menor cantidad de lecturas (poco más de 30 000 000). En la siguiente tabla se muestran los resultados de estos dos últimos ensamblados:

	S. dent_2	S. dent_3
Total 'genes'	38018	20436
Total transcripts	62111	50477
Percent GC	49.74	53.23
#Stats based in all transcript contigs		
Contig N50	2825	3417
Average length	1650.37	2156.91
TotalAssembledBases	102506311	108874126
Total Reads	104700744	31488479

S.dent_2=Assembly without the rehydration libraries
S.dent_3=Assembly with only the rehydration libraries

De la tabla anterior, podemos ver que curiosamente se ensamblan más de 20436 genes con tan solo 31488479 reads en el caso de las librerías rehidratadas, mientras que con 3 veces más reads en el caso de las deshidratadas se están obteniendo 38018 genes. También se puede observar que los transcritos ensamblados en las muestras de rehidratación son mucho más largos, considerando el total de bases ensambladas las muestras rehidratadas están incluso superando a las deshidratadas.

También se realizó el alineamiento de las lecturas de cada uno de los ensamblados contra sí mismos y contra el otro ensamblado:

Library	ASSEMBLY	
	S.dent_2	S.dent_3
100,70,50,10%	92.99%	2.34%
2h,6h	31.36%	90.05%

Al realizar los alineamientos se observó que la cantidad de lecturas de las muestras degradadas (rehidratación; 2h y 6h) que alineaban contra en el ensamblado de las muestras integras (100, 70, 50 y 10%) era de alrededor del 31.3%, en el caso inverso de las integras contra el ensamblado de las degradadas era todavía mucho menor de tan solo el 2.3%. Lo cual nos indica la baja similitud entre los dos ensamblados.

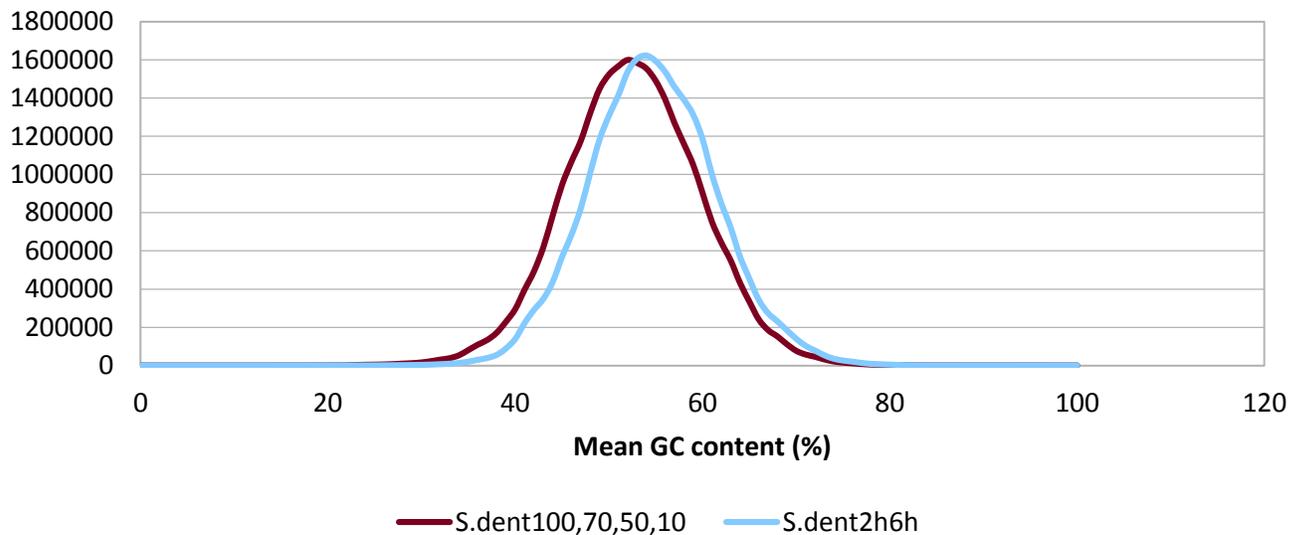
Con la finalidad de determinar qué tan similares o diferentes eran los distintos ensamblados, se realizó Blastn de uno contra otro. Indicando al algoritmo que retuviera solo el primer hit,

y tomando como filtro un BitScore ≥ 90 como significativo, se encontró lo siguiente:

Assembly	S.dent_2
DB	S.dent_3
Transcripts with hit	7861
Genes with hit	5652
% of the Total Genes	14.86%
Assembly	S.dent_3
DB	S.dent_2
Transcripts with hit	11289
Genes with hit	3702
% of the Total Genes	18.11%

Después del procedimiento anterior podemos concluir que la homología entre los distintos ensamblados (S.dent_2 y S.dent_3) es menor al 20%, menos de una quinta parte de los genes resultado del ensamblado con muestras de RNA integras se encuentra en el ensamblado de las muestras de RNA degradadas, y viceversa.

Lo que podría suponer que las muestras integras y las degradadas vienen de fuentes distintas, lo que podría ser confirmado revisando el contenido de GC:



Después de ver diferencias en el contenido de GC, nos dimos cuenta de que la muestra pudo haberse contaminado durante la rehidratación. Tal vez debido a que como el tejido está en descomposición en la rehidratación, permite el crecimiento de microorganismos. Por estas razones se descartó la especie S.dent en los análisis finales, hasta solucionar o encontrar una alternativa que permita la recuperación de los datos en la rehidratación de esta especie.

LISTA DE SUBCATEGORIAS ENRIQUECIDAS INDUCIDAS EN *S. lepidophylla*

CATEGORIA	SUBCATEGORIA	70%	50%	10%	2h	6h
Amino acid metabolism	Synthesis	2	0	30	17	22
Amino acid metabolism	Degradation	0	0	4	2	6
C1-metabolism	Glycine hydroxymethyltransferase	0	0	2	2	2
C1-metabolism	Formate dehydrogenase	1	0	0	0	0
C1-metabolism	Methylenetetrahydrofolate reductase	0	0	3	0	2
Cell	Organisation	5	5	29	17	27
Cell	Division	0	0	5	3	3
Cell	Cycle	3	0	12	5	9
Cell	Vesicle transport	0	0	4	3	6
Cell wall	Precursor synthesis	0	0	13	6	14
Cell wall	Cellulose synthesis	0	0	3	2	0
Cell wall	Cell wall proteins	0	1	5	4	5
Cell wall	Degradation	0	0	0	1	3
Cell wall	Modification	1	1	10	6	4
Cell wall	Pectin*esterases	0	0	4	1	1
Development	Storage proteins	0	0	3	1	2
Development	LEA	1	0	5	4	5
Development	Unspecified	4	0	14	10	10
DNA	Synthesis/chromatin structure	0	1	15	9	11
DNA	Repair	0	0	1	0	1
DNA	Unspecified	1	1	4	3	3
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	Citrate synthase	0	0	0	1	0
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	Malate DH	0	0	1	0	1
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	PEPCK	2	0	1	1	1
Glycolysis	Cytosolic branch	3	0	16	10	14
Glycolysis	Plastid branch	2	0	5	1	2
Glycolysis	Unclear/dually targeted	0	0	1	1	1
Hormone metabolism	Abscisic acid	3	2	4	2	0
Hormone metabolism	Auxin	1	1	6	5	4
Hormone metabolism	Brassinosteroid	0	0	6	4	4
Hormone metabolism	Cytokinin	1	0	1	1	0
Hormone metabolism	Ethylene	0	0	3	2	1
Hormone metabolism	Gibberelin	0	0	2	2	2
Hormone metabolism	Jasmonate	0	0	8	5	6
Lipid metabolism	FA synthesis and FA elongation	0	0	13	5	9
Lipid metabolism	Glycolipid synthesis	0	0	1	0	2
Lipid metabolism	FA desaturation	0	0	1	2	2
Lipid metabolism	Phospholipid synthesis	0	0	2	0	1
Lipid metabolism	Glycerol metabolism	0	0	1	0	1
Lipid metabolism	Lipid transfer proteins etc	0	0	1	0	1
Lipid metabolism	'Exotics' (steroids, squalene etc)	0	0	3	3	2
Lipid metabolism	Lipid degradation	1	1	7	4	5
Metal handling	Acquisition	0	0	1	0	0
Metal handling	Binding, chelation and storage	1	0	8	5	7
Minor CHO metabolism	Trehalose	2	0	0	0	0
Minor CHO metabolism	Others	1	0	1	0	1
Miscellaneous enzyme families	misc2	0	0	1	1	1
Miscellaneous enzyme families	Cytochrome P450	0	0	3	1	5
Miscellaneous enzyme families	Alcohol dehydrogenases	0	0	3	3	3
Miscellaneous enzyme families	Peroxidases	1	0	22	14	17
Miscellaneous enzyme families	Acid and other phosphatases	1	0	7	3	6
Miscellaneous enzyme families	Myrosinases-lectin-jacalin	0	0	3	2	4
Miscellaneous enzyme families	Plastocyanin-like	0	0	1	1	2
Miscellaneous enzyme families	UDP glucosyl and glucuronyl transferases	1	1	4	3	2
Miscellaneous enzyme families	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	0	0	9	7	6
Miscellaneous enzyme families	Short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	2	0	2	3	3
Miscellaneous enzyme families	Calcineurin-like phosphoesterase family protein	0	0	1	0	1
Miscellaneous enzyme families	GDSL-motif lipase	2	0	3	0	0
Miscellaneous enzyme families	Gluco-, galacto- and mannosidases	2	1	4	2	4
Miscellaneous enzyme families	Beta 1,3 glucan hydrolases	2	1	1	3	1
Miscellaneous enzyme families	Oxidases-copper, flavone etc	0	1	5	1	4
Miscellaneous enzyme families	Glutathione S transferases	0	0	16	10	14

Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	NADH-DH	0	1	19	9	17
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	Alternative oxidase	1	0	0	0	0
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	Cytochrome c reductase	0	0	6	3	6
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	Cytochrome c	0	0	3	2	2
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	Cytochrome c oxidase	0	0	5	2	4
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	F1-ATPase	2	1	9	9	9
N-metabolism	Nitrate metabolism	0	0	1	1	2
N-metabolism	Ammonia metabolism	0	0	4	3	4
N-metabolism	N-degradation	0	0	1	1	1
Not assigned	No ontology	6	5	54	24	30
Not assigned	Unknown	4	6	76	48	65
Nucleotide metabolism	Degradation	0	0	2	1	2
Nucleotide metabolism	Salvage	0	0	3	2	2
Nucleotide metabolism	Phosphotransfer and pyrophosphatases	2	1	6	5	6
OPP	Oxidative PP	1	0	3	1	2
OPP	Non-reductive PP.transketolase	0	0	4	3	4
OPP	Electron transfer	0	0	2	1	2
Polyamine metabolism	Synthesis	0	0	3	2	1
Protein	aa activation.asparagine-tRNA ligase	1	0	1	4	3
Protein	Synthesis.Ribosomal protein	44	0	162	117	159
Protein	Synthesis.Ribosome biogenesis	0	0	3	2	4
Protein	Synthesis.Initiation	1	0	7	9	7
Protein	Synthesis.Elongation	2	0	9	5	9
Protein	Targeting	1	1	16	10	13
Protein	Postranslational modification	5	2	16	9	11
Protein	Degradation	6	1	69	43	56
Protein	Folding	1	0	14	6	11
Protein	Assembly and cofactor ligation	0	1	0	0	1
PS	Lightreaction.Photosystem II	0	1	12	0	0
PS	Lightreaction.Photosystem I	0	0	7	2	3
PS	Lightreaction.ATP synthase	0	1	0	0	0
PS	Lightreaction.Other electron carrier (ox/red)	0	0	1	0	1
PS	Photorespiration	0	0	1	0	2
PS	Calvin cycle	1	0	10	4	4
Redox	Thioredoxin	1	0	6	5	5
Redox	Ascorbate and glutathione	0	1	14	9	13
Redox	Glutaredoxins	1	0	2	0	1
Redox	Peroxioredoxin	0	0	1	1	1
Redox	Dismutases and catalases	1	0	5	2	3
Redox	misc	0	0	3	1	2
RNA	Processing	1	0	4	6	3
RNA	Transcription	0	1	1	1	2
RNA	Regulation of transcription	14	6	36	27	27
RNA	RNA binding	1	0	10	6	6
S-assimilation	ATPS	0	0	3	3	3
S-assimilation	AKN	0	0	0	0	1
S-assimilation	Sulfite redox	0	0	1	0	1
Secondary metabolism	Isoprenoids	0	1	6	4	8
Secondary metabolism	Simple phenols	0	0	1	0	0
Secondary metabolism	Phenylpropanoids.Lignin biosynthesis	2	0	9	7	7
Secondary metabolism	Phenylpropanoids	0	0	2	0	1
Secondary metabolism	Sulfur-containing.Glucosinolates	0	0	6	1	4
Secondary metabolism	Wax	0	0	1	1	0
Secondary metabolism	Flavonoids	1	1	3	0	2
Signalling	Phosphorelay	0	0	1	1	1
Signalling	Light	0	0	1	0	0
Signalling	Receptor kinases	0	3	1	2	3
Signalling	Calcium	3	0	18	14	11
Signalling	Phosphinositides	0	0	1	1	1
Signalling	G-proteins	1	0	15	7	14
Signalling	14-3-3 proteins	0	0	7	5	6

Signalling	misc	0	0	0	1	1
Stress	Biotic	1	2	20	12	12
Stress	Abiotic.Heat	0	0	17	7	9
Stress	Abiotic	0	0	4	4	4
Stress	Abiotic.Cold	0	0	5	3	5
Stress	Abiotic.Drought/salt	1	0	9	5	6
Stress	Abiotic.Unspecified	1	1	15	10	13
TCA/org transformation	TCA	0	0	23	13	17
TCA/org transformation	Other organic acid transformats	0	0	7	3	4
TCA/org transformation	Carbonic anhydrases	0	0	2	1	1
Transport	p- and v-ATPases	1	1	19	13	18
Transport	NDP-sugars at the ER	0	0	0	1	0
Transport	Metal	2	0	2	1	2
Transport	Unspecified cations	0	0	0	1	0
Transport	Potassium	0	0	1	0	1
Transport	ABC transporters and multidrug resistance systems	0	0	3	2	2
Transport	Major Intrinsic Proteins	0	0	14	14	15
Transport	Sugars	5	1	5	3	0
Transport	Porins	0	0	3	3	3
Transport	Calcium	3	0	0	0	0
Transport	Amino acids	0	1	1	1	1
Transport	H+ transporting pyrophosphatase	0	0	2	1	2
Transport	Phosphate	0	1	3	0	2
Transport	Metabolite transporters at the envelope membrane	0	0	2	2	2
Transport	Metabolite transporters at the mitochondrial membrane	2	0	5	5	3
Transport	Membrane system unknown	0	0	1	0	1
Transport	misc	1	0	5	2	4

LISTA DE SUBCATEGORIAS ENRIQUECIDAS INDUCIDAS EN *S. extensa*

CATEGORIA	SUBCATEGORIA	70%	50%	10%	2h	6h
Amino acid metabolism	Synthesis	1	8	5	2	0
Amino acid metabolism	Degradation	0	1	3	1	0
C1-metabolism	Glycine hydroxymethyltransferase	0	2	0	0	0
C1-metabolism	Formate dehydrogenase	0	0	0	1	0
DNA	Synthesis/chromatin structure	2	4	3	3	1
DNA	Repair	0	0	0	1	0
Fermentation	Aldehyde deshydrogenase	0	1	0	1	0
Fermentation	PDC	0	0	0	1	0
Fermentation	ADH	0	1	0	0	0
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	Malate synthase	0	0	0	1	0
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	Malate DH	0	1	0	0	0
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	PEPCK	0	0	0	2	0
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	Isocitrate lyase	1	3	0	2	0
Glycolysis	Cytosolic branch	0	6	1	3	0
Glycolysis	Plastid branch	0	1	0	1	0
Hormone metabolism	Auxin	2	1	4	1	1
Hormone metabolism	Brassinosteroid	0	0	1	0	0
Hormone metabolism	Gibberelin	1	2	0	0	0
Hormone metabolism	Jasmonate	0	1	1	0	0
Lipid metabolism	FA synthesis and FA elongation	0	2	1	0	0
Lipid metabolism	Phospholipid synthesis	1	0	2	1	0
Lipid metabolism	Glycerol metabolism	0	0	0	1	0
Lipid metabolism	'Exotics' (steroids, squalene etc)	0	0	1	2	0
Lipid metabolism	Lipid degradation	0	2	3	1	1
Metal handling	Binding, chelation and storage	0	2	0	0	0
Minor CHO metabolism	Raffinose family	0	6	0	0	0
Minor CHO metabolism	Trehalose	0	0	0	1	0
Minor CHO metabolism	Myo-inositol	0	2	0	0	0
Minor CHO metabolism	Others	0	0	1	0	0
Minor CHO metabolism	Callose	1	0	0	0	0
Miscellaneous enzyme families	Cytochrome P450	0	2	1	0	0
Miscellaneous enzyme families	Peroxidases	0	2	2	0	1
Miscellaneous enzyme families	Acid and other phosphatases	0	2	1	0	0
Miscellaneous enzyme families	UDP glucosyl and glucuronyl transferases	0	0	1	0	1

Miscellaneous enzyme families	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	0	1	0	0	0
Miscellaneous enzyme families	Short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	0	1	0	1	1
Miscellaneous enzyme families	GCN5-related N-acetyltransferase	0	0	1	0	1
Miscellaneous enzyme families	Gluco-, galacto- and mannosidases	1	1	0	0	1
Miscellaneous enzyme families	Beta 1,3 glucan hydrolases	0	0	2	0	0
Miscellaneous enzyme families	Glutathione S transferases	0	2	2	0	0
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	NADH-DH	0	7	7	7	2
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	Cytochrome c reductase	0	1	1	2	1
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	Cytochrome c oxidase	0	3	3	3	2
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis	F1-ATPase	0	3	2	5	0
N-metabolism	Nitrate metabolism	0	1	0	0	0
N-metabolism	Ammonia metabolism	0	1	0	1	0
Not assigned	No ontology	8	11	19	12	15
Not assigned	Unknown	0	13	12	6	1
Protein	Synthesis.Ribosomal protein	0	10	4	50	0
Protein	Synthesis.Initiation	0	4	1	1	0
Protein	Synthesis.Elongation	0	3	0	2	0
Protein	Targeting	1	1	0	0	0
Protein	Postranslational modification	2	1	3	4	2
Protein	Degradation	2	17	13	6	3
Protein	Folding	0	0	2	0	0
Protein	Glycosylation	1	0	2	1	0
Protein	Assembly and cofactor ligation	0	2	1	1	1
PS	Lightreaction.Photosystem II	1	25	10	5	3
PS	Lightreaction.Photosystem I	1	21	6	3	1
PS	Lightreaction.Cytochrome b6/f	0	1	1	0	0
PS	Lightreaction.ATP synthase	0	5	2	2	1
PS	Lightreaction.Other electron carrier (ox/red)	0	3	1	0	0
PS	Photorespiration	0	1	0	0	0
PS	Calvin cycle	0	13	5	2	1
Redox	Thioredoxin	0	2	0	0	0
Redox	Ascorbate and glutathione	0	4	3	0	0
Redox	Heme	0	1	0	0	0
Redox	Glutaredoxins	0	1	0	0	0
Redox	Dismutases and catalases	0	1	1	0	0
Redox	misc	0	0	1	0	0
RNA	Processing	0	1	0	0	0
RNA	Transcription	0	4	3	4	1
RNA	Regulation of transcription	0	6	11	10	2
RNA	RNA binding	0	4	1	1	0
Secondary metabolism	Isoprenoids	0	2	0	0	0
Secondary metabolism	Simple phenols	0	0	0	0	1
Secondary metabolism	Phenylpropanoids	0	3	2	1	1
Secondary metabolism	Sulfur-containing.Glucosinolates	0	1	0	0	0
Secondary metabolism	Flavonoids	0	3	2	1	2
Signalling	Receptor kinases	0	1	1	1	0
Signalling	Calcium	2	1	3	1	0
Signalling	Phosphoinositides	0	0	1	0	0
Signalling	MAP kinases	0	1	1	0	0
Signalling	14-3-3 proteins	0	1	0	0	0
Stress	Biotic	0	1	3	0	1
Stress	Abiotic.Heat	0	1	2	2	0
Stress	Abiotic.Cold	0	1	0	0	1
Stress	Drought/salt	0	0	1	0	0
Stress	Abiotic.Unspecific	0	1	2	0	0
TCA/org transformation	TCA	0	0	1	1	0
TCA/org transformation	Other organic acid transformatons	0	4	0	0	0
TCA/org transformation	Carbonic anhydrases	0	1	1	0	0
Tetrapyrrole synthesis	Magnesium chelatase	0	1	0	0	0
Tetrapyrrole synthesis	Protochlorophyllide reductase	0	2	0	0	0
Tetrapyrrole synthesis	glu-tRNA reductase	0	1	0	0	0
Tetrapyrrole synthesis	Heme oxygenase	0	1	0	0	0

Tetrapyrrole synthesis	Porphobilinogen deaminase	0	0	0	1	0
Transport	p- and v-ATPases	0	1	1	1	0
Transport	Nucleotides	0	0	0	1	0
Transport	Metal	0	0	0	1	0
Transport	Peptides and oligopeptides	0	0	0	1	0
Transport	Unspecified cations	0	1	1	2	0
Transport	Potassium	1	0	1	1	0
Transport	ABC transporters and multidrug resistance systems	0	1	2	3	1
Transport	Major Intrinsic Proteins	0	2	4	1	0
Transport	Sugars	0	0	0	1	0
Transport	Calcium	1	0	1	2	0
Transport	Metabolite transporters at the mitochondrial membrane	0	1	1	1	0
Transport	misc	0	2	0	0	0

LISTA DE SUBCATEGORIAS ENRIQUECIDAS INDUCIDAS EN *S. pallescens*

CATEGORIA	SUBCATEGORIA	70%	50%	10%	2h	6h
Development	Storage proteins	3	3	4	1	1
Development	LEA	0	1	1	1	1
Development	Unspecified	2	5	6	9	3
DNA	Synthesis/chromatin structure	0	0	1	1	0
DNA	Repair	0	1	1	0	0
Fermentation	Aldehyde deshydrogenase	1	0	0	0	0
Fermentation	PDC	0	1	3	1	0
Gluconeogenesis/glyoxylate cycle	Isocitrate lyase	2	0	0	0	0
Hormone metabolism	Abscisic acid	0	4	4	5	2
Hormone metabolism	Auxin	1	1	0	0	0
Hormone metabolism	Cytokinin	1	0	1	0	0
Hormone metabolism	Ethylene	0	0	0	1	1
Hormone metabolism	Gibberelin	0	0	0	0	1
Hormone metabolism	Jasmonate	0	0	0	0	2
Hormone metabolism	Salicylic acid	1	0	0	0	0
Lipid metabolism	FA synthesis and FA elongation	1	1	1	1	1
Lipid metabolism	TAG synthesis	0	2	2	2	0
Lipid metabolism	Glycerol metabolism	0	1	1	1	0
Lipid metabolism	Lipid degradation	0	0	4	5	1
Major CHO metabolism	Synthesis.Sucrose	0	0	1	1	0
Major CHO metabolism	Degradation.Starch	1	2	3	3	2
Miscellaneous enzyme families	Cytochrome P450	3	1	1	0	0
Miscellaneous enzyme families	Alcohol dehydrogenases	0	1	1	1	1
Miscellaneous enzyme families	Peroxidases	1	0	1	0	2
Miscellaneous enzyme families	Acid and other phosphatases	1	1	1	2	1
Miscellaneous enzyme families	Plastocyanin-like	0	0	1	1	0
Miscellaneous enzyme families	UDP glucosyl and glucuronyl transferases	3	4	7	8	6
Miscellaneous enzyme families	Short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	0	0	0	0	1
Miscellaneous enzyme families	GDSL-motif lipase	0	1	1	1	1
Miscellaneous enzyme families	Oxidases-copper, flavone etc	0	0	1	0	2
N-metabolism	N-degradation	1	0	0	0	0
Polyamine metabolism	Degradation	1	0	1	0	0
Protein	Synthesis.Ribosomal protein	0	0	0	3	4
Protein	Synthesis.Elongation	0	0	1	1	2
Protein	Posttranslational modification	2	2	5	6	2
Protein	Degradation	1	5	9	15	5
Protein	Folding	0	0	0	1	0
PS	Lightreaction.Photosystem II	0	0	0	0	2
PS	Calvin cycle	0	0	1	1	1
Redox	Thioredoxin	0	1	1	1	0
Redox	Ascorbate and glutathione	0	2	2	2	2
RNA	Processing	0	1	1	1	0
RNA	Transcription	0	0	0	2	0
RNA	Regulation of transcription	5	13	17	25	13
Secondary metabolism	Isoprenoids	0	0	0	0	1
Secondary metabolism	Simple phenols	0	0	0	1	1
Secondary metabolism	Phenylpropanoids.Lignin biosynthesis	0	0	4	2	2
Secondary metabolism	Sulfur-containing.Glucosinolates	1	1	1	1	1
Secondary metabolism	Flavonoids	0	1	4	2	2

Stress	Biotic	1	1	4	4	1
Stress	Abiotic.Heat	0	2	1	4	10
Stress	Drought/salt	0	0	0	1	0
Stress	Abiotic.Unspecific	0	0	3	0	1
Transport	Metal	0	0	0	0	1
Transport	Unspecified cations	0	0	0	1	0
Transport	ABC transporters and multidrug resistance systems	1	2	1	2	3
Transport	Sugars	0	2	5	5	2
Transport	Metabolite transporters at the envelope membrane	0	0	0	1	0
Transport	Metabolite transporters at the mitochondrial membrane	0	1	1	2	1
Transport	misc	0	0	1	2	0