

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
**CAMPUS TUXTEPEC**

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DURANTE EL CICLO  
DIURNO BAJO ESTRÉS POR SUMERSIÓN EN *Brachypodium*  
*distachyon* ECOTIPOS Bd-21 Y Bd21-3**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**LUCISABEL MEDINA CHÁVEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. JULIÁN MARIO PEÑA CASTRO**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Octubre, 2021**





# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2021/MB/079
ASUNTO	Jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 07 de julio de 2021

**C. LUCISABEL MEDINA CHÁVEZ**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Jacqueline Capataz Tafur	Universidad del Papaloapan	Presidente
Dr. Julián Mario Peña Castro	Universidad del Papaloapan	Secretario
Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla	Vocal
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Universidad del Papaloapan	Suplente 1
Dr. Edgar García López	Universidad del Papaloapan	Suplente 2

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*

Boo lo-tama, chí jí jú

**Dr. José Abad Zavaleta**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vice-Rector Académico  
Vo. Bp.



VICE-RECTORIA ACADEMICA

C.c.p. Dr. Julián Mario Peña Castro – Director de Posgrado  
C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Coordinadora de Maestría en Biotecnología  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares  
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2021/214
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 14 de octubre de 2021

**M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA**  
VICE-RECTOR ACADÉMICO  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Lucisabel Medina Chávez**, con matrícula **18140009**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Identificación de genes expresados durante el ciclo diurno bajo estrés por sumersión en *Brachypodium distachylon* ecotipos Bd-21 y Bd21-3**", para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes

Atentamente  
*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú

**Dr. José Abad Zavaleta**

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Lucisabel Medina Chávez – Estudiante  
C.c.p. Dr. Julian Mario Peña Castro – Director de Tesis  
C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Coordinador de la maestría en Biotecnología  
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares  
C.c.p. Archivo

**CAMPUS TUXTEPEC**  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230

## CARTA DE RESPONSABILIDAD

Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de tesis "**Identificación de genes expresados durante el ciclo diurno bajo estrés por sumersión en *Brachypodium distachyon* ecotipos Bd-21 Y Bd21-3**" es responsabilidad de los C. Dr. **Julián Mario Peña Castro**, e Ing. **Lucisabel Medina Chávez** y que ni los datos experimentales ni el texto han sido aceptados o empleados para el otorgamiento de título, grado diferente o adicional al actual en el país o en el extranjero. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas y ésta fue examinada por un comité tutorial, conformado por: *Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, Dra. Edgar García López y Dr. Julián Mario Peña Castro*; así como un jurado de examen conformado: *Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes y Dr. Julián Mario Peña Castro* de acuerdo con el Reglamento General de Posgrado vigente, con la finalidad de darle seguimiento al estudiante, así como validar que es un trabajo de investigación original e inédito.

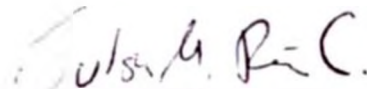
San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 22 de marzo del 2021.

ATENTAMENTE,



---

IBt. Lucisabel Medina Chávez



---

Dr. Julián Mario Peña Castro



## **RECONOCIMIENTO**

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Julián Mario Peña Castro.

Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de la beca CONACyT con número de becario 942366 en el marco del programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131. La investigación fue realizada con el financiamiento otorgado al proyecto CONACYT Ciencia Básica 287137.

# PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTE TRABAJO

## Congreso:

**Medina-Chávez L**, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM, 2021. Transcriptomic analysis of *Brachypodium distachyon* ecotypes of contrasting tolerance to flooding along a diurnal cycle under submergence stress. VIB Belgium. Plant Science for Climate Emergency Virtual Edition 2021. 7-8 junio 2021.

## AGRADECIMIENTOS

A **CONACyT** por la beca nacional de maestría 942366.

A la **Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec** por brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad estudiantil.

**Dr. Julián M. Peña Castro** por su tolerancia, por su confianza, conocimiento, apoyo y tiempo que invirtió en mí. Un excelente mentor en el ámbito profesional y personal, para mí es un honor haber formado parte de su grupo de trabajo.

**Dra. Blanca E. Barrera Figueroa** por su apoyo y conocimientos aportados a lo largo de este proyecto. Sin duda alguna un ejemplo como mujer, madre e investigadora.

**Dra. Piyada Juntawong de la Universidad Kasetsart de Tailandia** por su colaboración en la realización de este proyecto.

**Dr. Edgar García López** por todo su apoyo y conocimiento aportado a lo largo del posgrado. Y por ser revisor de esta tesis.

**Dra. Ariana A. Huerta Heredia** por sus conocimientos aportados y por revisora de esta tesis.

**Dra. Jacqueline Capataz Tafur** por darme un seguimiento durante todo el posgrado, por su colaboración y conocimientos aportados en la revisión de este trabajo.

**Dr. José Abad Zavaleta.** Por su apoyo y seguimiento en la elaboración de esta tesis.

## DEDICATORIA

A mí papá Jesús Medina por apoyarme todos estos años, por alentarme a seguir estudiando por su amor incondicional, por cuidarme, por quererme y por siempre estar al pendiente de mí. Te amo mucho pa.

A mí mamá Luz María Chávez por sus consejos, por alentarme a seguir estudiando, por estar todo el tiempo para mí, por quererme y por ser una mujer que me brinda paz, amor, fuerza y valentía en la vida. Te amo mami.

A mi hermano Jeshua Medina Chávez por brindarme su apoyo, por quererme y cuidarme como si tú fueras el hermano mayor, te quiero bro.

A mi sobrino Uriel Atenco por esa alegría que traes a la casa y por ser una más motivación para ser un buen ejemplo para ti, te quiero mucho pequeñín.

A mi segunda madre Elizabeth Rodríguez Velasco por su apoyo en todos los aspectos de mi vida, por abrirme las puertas de su hogar y de su corazón por darme su apoyo y cariño. Siempre será una persona muy importante en mi vida.

A la familia Rodríguez Velasco, José, Martha, Rafaela, Ana, Elia y Juan por ser para mí una segunda familia en todos los aspectos por permitirme convivir con ustedes por su cariño y tiempo.

A mis compañeros y amigos del posgrado; MBt. Arturo Martínez por sus conocimientos compartidos y por brindarme una sincera amistad.

A MBt. Mayra Santiago por todas esas tardes juntas por tu amistad y por tu apoyo. Te quiero mucho.

A MBt Dalia Chávez por todos esos desayunos y pláticas interminables, y por tu amistad.

A mis profesores de la universidad Dra. Galdy Hernández, Mtro. José Luis, Ing. Juan Carlos Tapia, Dr. Bersain Moreno, Dra. Estrella, Dra. Paola, Dra. Alejandra Tovar, Mtra. Norma, Mtro. Enrique Zitlapopoca Gracias por todos los conocimientos compartidos ustedes fueron la base de mis conocimientos.

A todas y cada una de las personas que me apoyaron, que me alentaron y que estuvieron durante este proceso tanto académico como personal.

*GRACIAS POR FORMAR PARTE DE MI VIDA.*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1 Asociación de los cambios climáticos con la inundación.	3
1.2 Las plantas y sus respuestas al exceso de agua	6
1.3 Homeostasis energética celular durante la inundación.	8
1.4 Homeostasis de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	13
1.5 Regulación de los ciclos circadianos en inundación	16
<b>2. Justificación</b>	<b>19</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>22</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
6.1 Material Vegetal	23
6.2 Establecimiento y germinación de <i>Brachypodium distachyon</i>	23
6.3 Colecta de la primera generación de semillas	24
6.4 Ensayos de sumersión	24
6.5 Análisis estadístico	27
6.6 Datos fisiológicos de daño en hojas	27
6.7 Ensayo de sumersión para la colecta de RNA y secuenciación	28
6.8 Extracción de RNA total	33
6.9 Cuantificación de RNA y verificación de integridad	34
6.10 Secuenciación RNA-seq utilizando la plataforma HiSeq Illumina.	35
6.11 Análisis Bioinformático	35
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
7.1 Línea uno de crianza	37
7.2 Ensayos de tolerancia al estrés generado por sumersión completa	37
7.3 Daños fisiológicos en hojas de <i>Brachypodium distachyon</i>	41
7.4 Calidad de muestras secuenciadas por RNA-seq	44

<b>7.5</b>	<b>Análisis de RNA-seq</b>	<b>45</b>
<b>7.6</b>	<b>Análisis transcriptómico de ZT0h (amanecer). Genes regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos</b>	<b>46</b>
7.6.1	ZT0h (Amanecer). Transcritos exclusivos de Bd21-3	48
7.6.2	ZT0h (Amanecer). Transcritos exclusivos de Bd-21	49
<b>7.7</b>	<b>Análisis transcriptómico de ZT8h (Medio día) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.</b>	<b>50</b>
7.7.1	ZT8h (Medio día). Transcritos exclusivos de Bd21-3	51
7.7.2	ZT8h (Medio día). Transcritos exclusivos de Bd-21	52
<b>7.8</b>	<b>Análisis transcriptómico de ZT16h Antes de Anochecer (AA) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.</b>	<b>52</b>
7.8.1	ZT16h Antes de Anochecer (AA). Transcritos exclusivos de Bd21-3	54
7.8.2	ZT16h Antes de Anochecer (AA). Transcritos exclusivos en Bd-21	55
<b>7.9</b>	<b>Análisis transcriptómico de ZT20h Media Noche (MN) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.</b>	<b>55</b>
7.9.1	ZT20h Media Noche (MN). Transcritos exclusivos de Bd21-3	57
7.9.2	ZT20h Media Noche (MN). Transcritos exclusivos de Bd-21	57
<b>7.10</b>	<b>Análisis transcriptómico ZT24h Nuevo Amanecer (NA) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.</b>	<b>59</b>
7.10.1	ZT24h Nuevo Amanecer (NA). Transcritos exclusivos de Bd21-3	61
7.10.2	ZT24h Nuevo Amanecer (NA). Transcritos exclusivos de Bd-21	62
<b>7.11</b>	<b>Agrupación de genes y dinámica de regulación durante el ciclo diurno</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 1.</b>		<b>84</b>
<b>ANEXO 2</b>		<b>85</b>
	<i>Condiciones Optimizadas; Experimentos de sumersión respuestas interesantes sobre cambios de temperatura</i>	<b>85</b>
	<i>Experimentos de sumersión, respuestas interesantes sobre la densidad de plantas</i>	<b>86</b>
<b>ANEXO 3</b>		<b>88</b>
	<i>Cálculo de RIN de las 90 muestras colectadas.</i>	<b>88</b>
<b>ANEXO 4</b>		<b>92</b>
<b>ANEXO 5.</b>		<b>95</b>
	<i>Descripción de Brachypodium distachyon.</i>	<b>95</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Graficas de porcentajes de pérdidas económicas agrícolas respecto a diferentes estreses abióticos.....	4
<b>Figura 2:</b> Predicciones meteorológicas de inundaciones y sequias para las diferentes partes del mundo.....	5
<b>Figura 3:</b> Plantas en hábitats con diferente disponibilidad de agua.....	8
<b>Figura 4:</b> Clasificación de los fenómenos de inundación.....	9
<b>Figura 5:</b> Múltiples eventos de señalización metabólica.....	11
<b>Figura 6:</b> Respuesta de mutantes <i>gdh Arabidopsis thaliana</i> ante anoxia y reoxigenación.....	13
<b>Figura 7:</b> Mecanismos de respuestas de las plantas a la inundación. ....	15
<b>Figura 8:</b> Estrategia experimental desarrollada en el presente proyecto. ....	22
<b>Figura 9:</b> Procedimiento de llenado de macetas para brindarles mayor estabilidad. ....	25
<b>Figura 10:</b> Técnica de ensayos de sumersión.....	26
<b>Figura 11:</b> Índice para agrupar el porcentaje dañado de las hojas después del tiempo de recuperación ante el estrés generado por sumersión. ....	27
<b>Figura 12:</b> Representación de la configuración experimental para el análisis transcriptómico.....	29
<b>Figura 13:</b> Primer ensayo de sumersión de ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> .....	39
<b>Figura 14:</b> Segundo ensayo de sumersión de ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> .....	40
<b>Figura 15:</b> Proporción de daño en hojas de los ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21 de <i>Brachypodium distachyon</i> .....	42
<b>Figura 16:</b> Porcentaje de supervivencia de los tres diferentes ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> .....	43
<b>Figura 17:</b> Verificación de la integridad de RNA, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. ....	44
<b>Figura 18:</b> Verificación de integridad y calidad de RNA de hoja de <i>Brachypodium distachyon</i> .....	45
<b>Figura 19:</b> Transcritos regulados en ZT0h. ....	47
<b>Figura 20:</b> Transcritos regulados en ZT8h. ....	50
<b>Figura 21:</b> Transcritos de la familia SAUR (GO:0009733) de regulación de auxina regulados negativamente en ambos ecotipos en sumersión (ZT8).....	51

<b>Figura 22:</b> Transcritos regulados en ZT16h .....	53
<b>Figura 23:</b> Transcritos regulados de ZT20h.....	56
<b>Figura 24:</b> Transcritos expresados en la colecta de ZT20h.. .....	58
<b>Figura 25:</b> Transcritos regulados de ZT24h.. .....	60
<b>Figura 26:</b> Regulación de genes involucrados en el Evening Complex (PRR, EC) durante el estrés por sumersión en <i>Brachypodium</i> .....	69
<b>Figura 27:</b> Regulación de genes involucrados en el Night Complex (NC) de <i>Brachypodium</i> .. .....	70
<b>Figura 28:</b> Outputs del ciclo circadiano, detectados como expresados diferencialmente en horas tempranas del día y durante la sumersión. ....	71
<b>Figura 29:</b> Outputs del ciclo circadiano detectados como expresados diferencialmente en horas tardías del día y en la noche durante la sumersión .....	72
<b>Figura 30:</b> Primer ensayo de sumersión para la evaluación de tolerancia de los ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21 .....	84
<b>Figura 31:</b> Respuesta de las plantas inundadas en temperaturas menores. ....	87
<b>Figura 32:</b> Fisiología de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Codificación de las 90 muestras colectadas, para facilitar su manejo. CCN (Control de crecimiento Normal) y CBL (Control de Baja Luz).....	30
<b>Tabla 2:</b> Porcentajes de germinación de las semillas de los tres ecotipos sembrados en la primera línea de crianza Bd-21, Bd2-3 y Bd21-3.....	37
<b>Tabla 3:</b> Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT0h.....	63
<b>Tabla 4:</b> Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT8h.....	64
<b>Tabla 5:</b> Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT16h.....	65
<b>Tabla 6:</b> Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT20h.....	66
<b>Tabla 7:</b> Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT24h.....	67
<b>Tabla 8:</b> Información de librerías, las 90 bibliotecas secuenciadas mediante el análisis RNA-seq.....	92



## RESUMEN

El estrés por inundación causa pérdidas millonarias globalmente. Los transcriptomas de plantas de cultivo, así como plantas modelo han sido estudiados en diferentes condiciones de estrés por inundación. Sin embargo, no hay un transcriptoma que caracterice estas respuestas en un ciclo diurno. Se sabe que muchas respuestas a la inundación están reguladas de forma diurna en condiciones normales, por ejemplo, la degradación de almidón o la síntesis de hormonas. En este trabajo se estudió el transcriptoma diurno bajo el estrés por inundación, así como en condiciones control. Se usaron dos ecotipos con tolerancia contrastante a la inundación de la planta modelo *Brachypodium distachyon*. Se aplicó el estrés por inundación a plantas de 15d bajo un ciclo diurno largo (16h luz / 8h oscuridad) y se colectaron muestras en los puntos ZT0 (amanecer), ZT8 (medio día), ZT16 (atardecer), ZT20 (media noche) y ZT24 (fin de noche). Todas las colectas fueron triplicadas y el RNA de las hojas se secuenció para obtener cuentas, expresión log<sub>2</sub>, bloques genéticos y análisis de ontología genética. Estos estudios indicaron que los genes del reloj circadiano mostraron una expresión alterada por el estrés, tanto en intensidad como en cambio de fase. Notablemente, la familia génica PRR del complejo vespertino (EC, Evening Complex) se reguló positivamente y cambió de fase por 8h. Los genes EC son reguladores maestros de un control inhibitorio en cascada que produce la oscilación característica del reloj circadiano. Aunque esta disrupción se detectó en los ecotipos tolerante y sensible, el perfil transcriptómico fue diferente. El ecotipo tolerante reguló de forma positiva en la inundación a genes de síntesis de poliaminas, metabolismo de fenilalanina y gluconeogénesis. Por otra parte, el ecotipo sensible reguló de forma diurna genes de biosíntesis de ABA, percepción de JA y síntesis de celulosa. Estos resultados se pueden utilizar en el futuro para incrementar la tolerancia de las plantas a la inundación con base en la oscilación génica diurna.

## ABSTRACT

Submergence causes multimillion crop losses worldwide. The transcriptomes of model and crop plants have been studied in different submergence conditions. However, there is not a transcriptome that characterizes the response to this stress in a diurnal cycle. Many responses to submergence are diurnally regulated in normal conditions, such as starch degradation, growth, or hormone synthesis. Here, we studied the diurnal transcriptome under submergence and control conditions of two ecotypes with contrasting flooding tolerance of the monocot model *Brachypodium distachyon*. We applied submergence stress to 15-day-old plants under a diurnal cycle (16h light/ 8h dark) and collected samples at ZT0 (dawn), ZT8 (midday), ZT16 (dusk), ZT20 (midnight), and at ZT24 (dawn). All collects were triplicates and RNA from leaves was sequenced to obtain RPKM, log2, gene clusters and GO. These analyses indicated that the circadian clock genes showed an altered expression by the stress, both by intensity and phase change. Notably, the PRR gene family of the Evening Complex was up regulated and phase-shifted by 8h. The Evening Complex genes are master checkpoints that control a backwards inhibition cascade that produces the characteristic expression oscillation of the circadian clock. Although this disruption was detected in both the tolerant and sensitive ecotypes, the transcriptomic output was different. The tolerant ecotype diurnally up regulated genes of polyamine synthesis, phenylalanine metabolism, and gluconeogenesis. On the other hand, the sensitive ecotype diurnally up regulated genes of ABA biosynthesis, JA perception, and cellulose synthesis. These results can be used to increase tolerance of plants to submergence based on the diurnal gene oscillation.

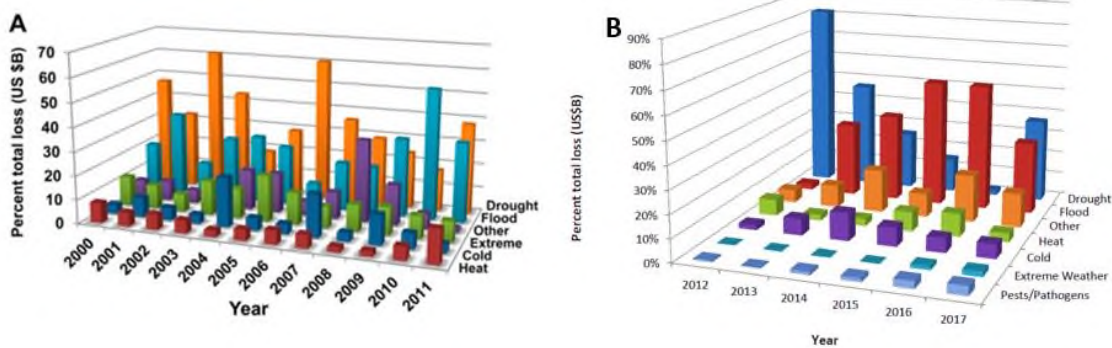
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Asociación de los cambios climáticos con la inundación.

A lo largo de 4.5 miles de millones años de evolución de la vida en la Tierra, los organismos han desarrollado mecanismos para adaptarse de forma natural a las condiciones medioambientales. En los últimos años, las actividades humanas como la Revolución Industrial y Tecnológica han causado modificaciones ambientales. Un ejemplo de ello es la acumulación de gases de efecto invernadero que están asociados con cambios climáticos altamente desfavorables, repercutiendo en daños económicos, sociales y ecológicos (Mora *et al.*, 2018; Slangen, 2018).

El calentamiento global ha provocado el incremento de la frecuencia e intensidad de fenómenos como las olas de calor, sequías, precipitaciones, tormentas, inundaciones, cambios en el nivel del mar, la cobertura natural del suelo y la química oceánica (Waters *et al.*, 2016). El Acuerdo de París sobre el cambio climático pretende limitar el calentamiento global a no más de 2°C antes de 2100, y de no cumplirse, se verían mayores daños económicos y sociales (Slangen, 2018).

Otros estudios se han centrado por conocer el listado de las tensiones abióticas que afectan el sector agrícola para tomar decisiones y actuar con diversas estrategias para asegurar el rendimiento de los principales cultivos. En 2012, Bailey-Serres *et al.* reportaron los porcentajes de pérdidas agrícolas en Estados Unidos causados por diferentes estreses abióticos como la sequía, la inundación, el frío, el calor, extremos y otros (Figura 1A). Las dos principales afectaciones que provocan las mayores pérdidas económicas en el sector agrícola son la sequía y la inundación (precipitaciones extremas, exceso de humedad, desbordamiento) de forma alternada. Recientemente, esta cuantificación se actualizó por The National Academies of Sciences, Engineering and Medicine (NASEM, 2019) corroborando el patrón anterior (Figura 1B).



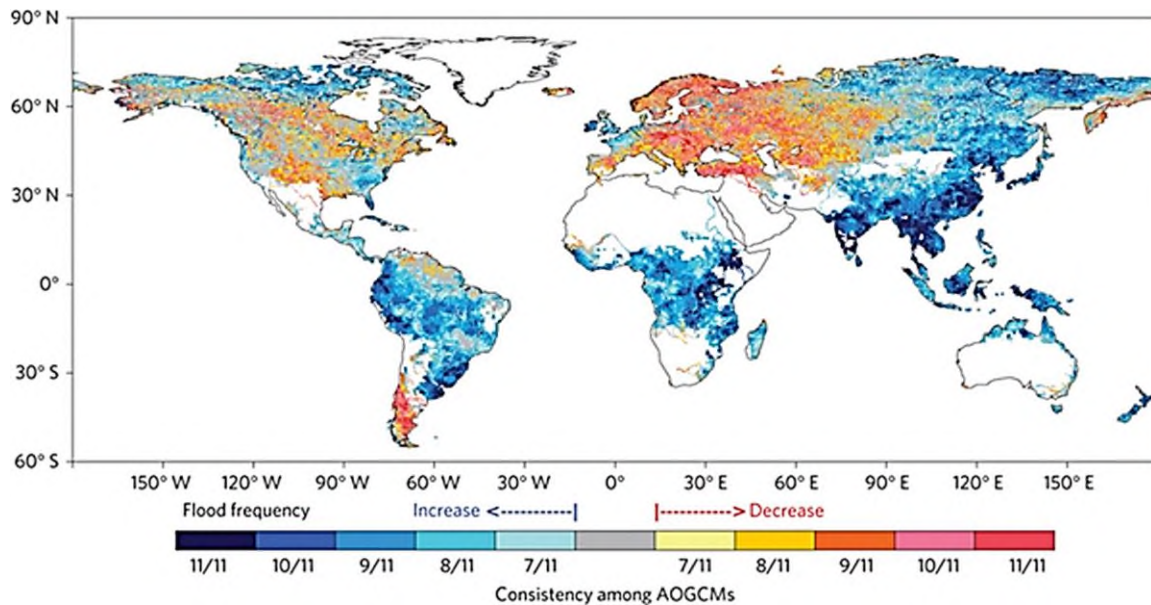
**Figura 1:** Graficas de porcentajes de pérdidas económicas agrícolas respecto a diferentes estreses abióticos en Estados Unidos durante las últimas dos décadas (Bailey- Serres *et al.*, 2012; The National Academies of Sciences, Engineering and Medicine (2019).

En México el CENAPRED registró que se ha incrementado la presencia de estos eventos climatológicos adversos y se pueden correlacionar los registros de los huracanes más peligrosos con los años en donde se observa un aumento en el porcentaje de pérdidas por inundación, principalmente en los años de 2015 y 2016 (Domínguez *et al.*, 2016).

En el nivel global, esta situación también se ha reportado por estudios que usan modelos climatológicos y que indican un aumento en la intensidad de precipitaciones y extremos húmedos (Figura 2), junto con una disminución en la frecuencia de eventos de precipitación y, por lo tanto, un alargamiento de los períodos secos (Giorgi *et al.*, 2018), aunque de manera natural la presencia de periodos lluviosos es necesaria para la diversidad y estabilidad de los ecosistemas, por efecto del cambio climático, la presencia de precipitaciones excesivas puede generar impactos al medio ambiente, al sector agrícola y a las poblaciones (Saldaña-Zorrilla, 2009).

México es un país dependiente del sector agrícola, y es altamente propenso a fenómenos hidrometeorológicos debido a que geográficamente se encuentra en una zona intertropical rodeada por dos océanos. Se ha observado de manera sustancial que el sector agrícola tiene un mayor vulnerabilidad ante estos fenómenos naturales, en especial con las inundaciones, repercutiendo directamente el ámbito social y económico al causar daños patrimoniales a los productores,

afectando la economía familiar, aumentando la pobreza de la región afectada, la migración de la población y en casos extremos, la inestabilidad del país por la interrupción del ciclo productivo, la reducción de los ingresos, el desempleo y el desabasto de alimentos (Saldaña-Zorrilla, 2009; Vega-Serratos *et al.*, 2018).



**Figura 2:** Predicciones meteorológicas de inundaciones y sequías para las diferentes partes del mundo. De acuerdo a 11 modelos climáticos, México será uno de los países más afectados en 9 de estos modelos con un alto índice de inundaciones. (Voesenek y Bailey-Serres, 2015)

De esta manera, en México las inundaciones son el efecto de fenómenos hidrometeorológicos como las depresiones, ciclones tropicales y los huracanes. La temporada de ciclones tropicales en el Atlántico inicia el 1 de junio y termina el 30 de noviembre. El mes de septiembre es el que históricamente registra un mayor número de ciclones tropicales que afectan directamente nuestras costas (Saldaña-Zorrilla, 2009; Salas y Jiménez, 2004).

En México durante los años de 1999 y 2016 se registraron diferentes fenómenos hidrometeorológicos, que causaron pérdidas por más de 23mil 383 millones de pesos. Tan solo en 2016 se presentaron altas pérdidas económicas afectando a diferentes estados por las severas inundaciones que sumaron 2 mil 92 millones de pesos para Puebla, 269 millones de pesos para Veracruz, 337 millones de pesos para Chiapas y mil 871 millones de pesos para Guerrero (Domínguez *et al.*, 2016). El desastre natural más caro para México fue el sismo de 1985 con

pérdidas de 4 mil 100 millones de dólares, seguido por los ciclones tropicales de 2013 “Ingrid” y “Manuel” con pérdidas de 3 mil 41.4 millones de dólares. Se estima que el 70% de pérdidas por desastres naturales es originado por lluvias fuertes e inundaciones (Domínguez y Jiménez, 2016).

Aunque en México no existen estadísticas suficientes para cuantificar el daño total de las inundaciones en el sector agrícola, el impacto económico por fenómenos hidrometeorológicos en Estados Unidos se calcula con el pago de seguros hacia los productores y nos puede dar una idea de la magnitud del problema. Tan solo durante 2001-2011 los gastos generados en Estados Unidos fueron de 24 mil millones de dólares (Bailey-Serres *et al.* 2012).

A pesar de que los huracanes forman parte del ciclo natural de lluvias, el sector agrícola ha puesto en práctica ciertas estrategias para contrarrestar sus efectos negativos. Se han desarrollado modelos de predicciones y evaluaciones de pérdidas de cultivos diseñados para detectar las zonas con un mayor índice y frecuencia de inundación. Son herramientas altamente útiles para planificar y aplicar soluciones que disminuyan el daño a los cultivos causado por las inundaciones (Mora *et al.*, 2018), no obstante, también se puede utilizar el conocimiento biológico de la expresión génica para que se asegure el rendimiento del cultivo ante un fenómeno de inundación (Fukao *et al.*, 2019; Bailey-Serres *et al.* 2019).

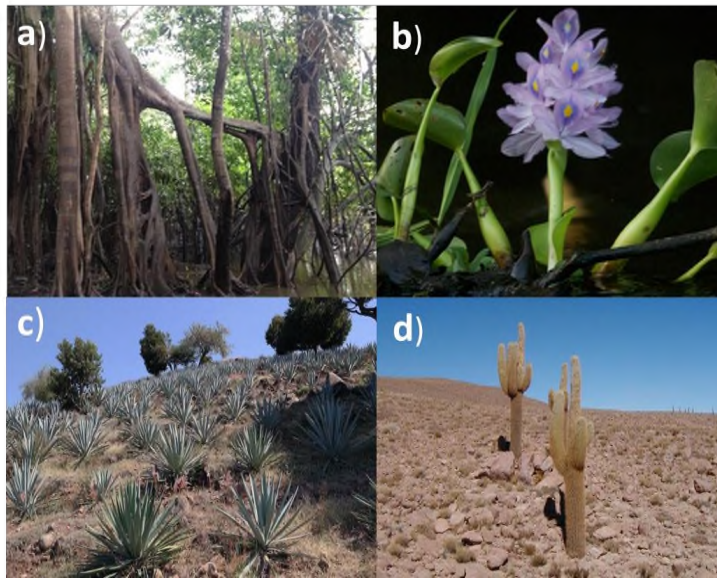
## **1.2 Las plantas y sus respuestas al exceso de agua**

Las plantas son organismos que se pueden encontrar en una gran diversidad de hábitats con la capacidad de vivir con diferente disponibilidad de agua (Figura 3). Sin embargo, las plantas domesticadas de mayor interés económico, principalmente los granos y cereales como el maíz, trigo, arroz, cebada, caña de azúcar y sorgo, son altamente susceptibles a diversas tensiones abióticas las cuales comprometen el rendimiento de los cultivos y su supervivencia (Bailey-Serres *et al.*, 2019).

Las plantas presentan receptores que les proporcionan información de lo que está sucediendo en el medio, de manera que pueden censar las condiciones a su

alrededor (Peña-Castro 2014). Existen respuestas específicas para el día y la noche, por ejemplo, cuánta glucosa deben sintetizar para mantener su metabolismo diario, y para ello asumen que durante un día normal realizan el proceso de fotosíntesis en concentraciones de oxígeno ( $O_2$ ) que se mantienen cercanas al 21%, pero durante la noche, las concentraciones de  $O_2$  endógeno se reducen como resultado de la respiración (Brauner *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2021), un fenómeno característicamente asociado a fenómenos de inundaciones (Fukao *et al.*, 2019).

Las adaptaciones fisiológicas de las plantas a las condiciones húmedas y prolongadas incluyen la formación de aerénquimas, pilis para retener gas en las hojas, y bolsas de flotación (Figura 3; Voesenek y Bailey-Serres, 2015). No obstante, pocos cultivos poseen estas características, y si las poseen (ej. aerénquimas) dificultan el crecimiento, la reproducción y su rendimiento (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). No todas las especies de plantas reaccionan de la misma manera ante el estrés por inundación, derivado de factores como diversidad genética intrínseca de cada especie y de cada individuo. Incluso ya se han encontrado ecotipos y cultivares de tolerancia variable que han permitido descubrir mecanismos que pueden ser utilizados biotecnológicamente para atenuar el daño del estrés (Puciarello y Perata, 2013; Mustroph, 2018).



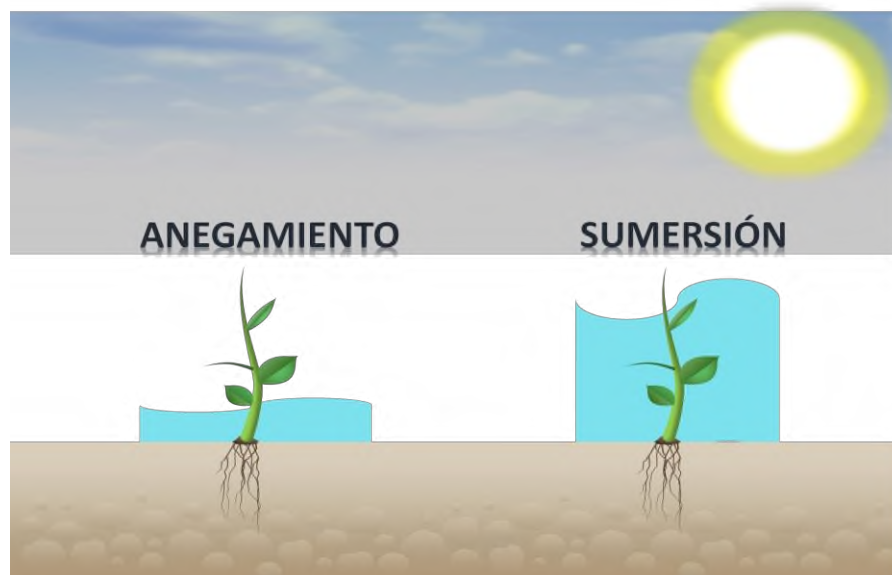
**Figura 3:** Plantas en hábitats con diferente disponibilidad de agua: a) *Ficus ssp.*, durante la temporada baja de agua, b) *Eichornia crassipes*, con peciolo elongados por una inundación, c) *Agave tequilana*, se encuentra en lugares desérticos, d) *Carnegiea gigantea*, endémico de los desiertos. (Voeselek y Bailey-Serres, 2015).

### 1.3 Homeostasis energética celular durante la inundación.

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en conocer los mecanismos moleculares que llevan a cabo las plantas cuando se encuentran bajo el estrés generado por la inundación. Existen diferentes tipos de inundaciones que varían en su profundidad, clasificándose en dos tipos: anegamiento y sumersión. El primer tipo de inundación cubre sólo las raíces, y el segundo cubre raíces y partes aéreas como el tallo y las hojas (Figura 4; Sasidharan *et al.*, 2017; Fukao *et al.*, 2019). En ambos casos, se presenta una disminución en la difusión de gases como  $O_2$  y el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) como consecuencia de la presencia excesiva de agua. De estos dos gases, la respuesta ante la disminución en la concentración de  $O_2$  es la que mejor se ha estudiado pues genera un estrés de tipo hipóxico que conlleva a una severa crisis energética al disminuir o limitar la eficiencia de las rutas aeróbicas de síntesis de ATP, principalmente al ciclo de los ácidos tricarbónicos y la cadena de transporte de electrones (Fukao *et al.*, 2019).

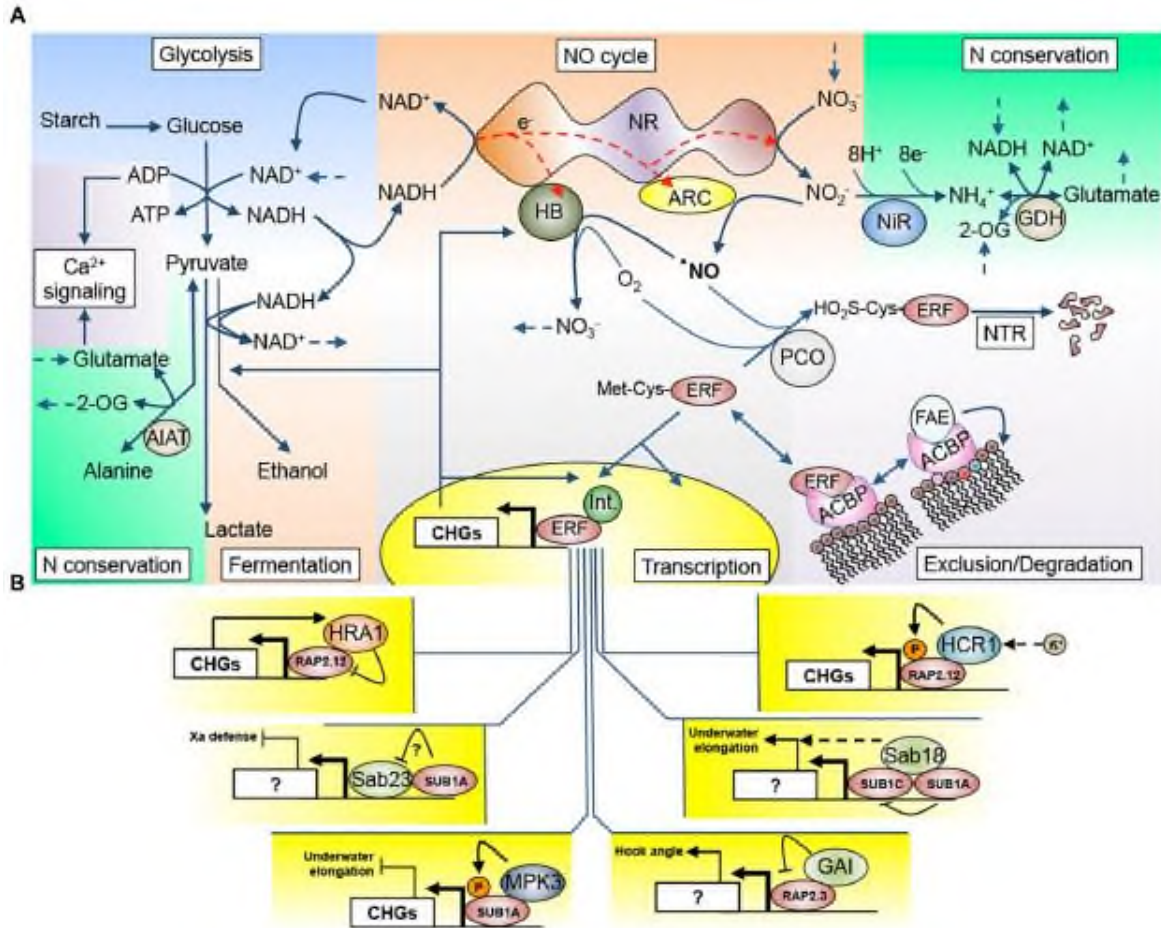
Al sufrir este tipo de estrés, las plantas presentan síntomas como retraso en el crecimiento, daño en los tejidos, clorosis, necrosis, e incluso llegando a ocasionar la muerte (Peña-Castro 2014; Yeung *et al.*, 2018). No obstante, el estrés por inundación es un estrés complejo, y hay pocos estudios del efecto en la planta de la disminución del CO<sub>2</sub>, la baja disponibilidad de luz, el efecto del ciclo diurno y la presencia de microorganismos patógenos en el entorno.

El análisis de la respuesta celular en diferentes modelos vegetales, indica que hay un consenso general en que el mantenimiento de la homeostasis energética celular es de importancia primaria (Fukao *et al.*, 2019). En diversas plantas se han asociado las respuestas metabólicas, hormonales y fisiológicas con cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y lípidos, glucólisis, vías de fermentación, síntesis de etileno, procesos mediados por el etileno, auxina y las vías de transducción de señales de especies reactivas de oxígeno (ROS) y calcio (Sasidharan *et al.*, 2018; Fukao *et al.*, 2019).



**Figura 4:** Clasificación de los fenómenos de inundación. Las inundaciones son clasificadas en anegamiento cuando el agua cubre sólo a las raíces (izquierda) y la sumersión en donde el agua también cubre los tejidos aéreos de la planta (derecha).

La respuesta molecular que activa la planta cuando se encuentra bajo un estrés hídrico es crucial para poder asegurar su supervivencia y el uso de carbohidratos es relevante para ello. Durante el estrés por inundación, la célula vegetal utiliza al almidón, su reserva principal de carbohidratos, para liberar glucosa que oxida a través de la glucólisis. Sin embargo, como se encuentra bajo un estrés por inundación, el piruvato producido no puede ser ingresado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos por la ausencia de  $O_2$  como receptor final de electrones. De tal manera, el piruvato se desvía hacia aceptores orgánicos de electrones disponibles como la alanina, el lactato y etanol, convirtiéndose la célula vegetal en una célula fermentativa (Voesenek y Bailey-Serres 2015; Fukao *et al.*, 2019). A su vez, otros electrones son transportados al ciclo del óxido nítrico (NO) donde la proteína hemoglobina (HB) tiene una actividad primordial en el balance del NO,  $O_2$  y nitrito ( $NO_3$ ), que son moléculas señalizadoras y estabilizadoras de factores de transcripción de respuesta al etileno (ERFs, Ethylene Responsive Factors) (Figura 5; Fukao *et al.*, 2019).



**Figura 5:** Múltiples eventos de señalización metabólica durante el estrés por inundación. A) Rutas metabólicas que llevan a cabo las plantas cuando se encuentran bajo un estrés por inundación. Se observan la glucólisis, señalización de iones de calcio, degradación de piruvato por vías alternas al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y la activación de la ruta fermentativa. B) Inducción de los ERFs al núcleo para activar la transcripción de los genes centrales de hipoxia (CHG) (Fukao *et al.*, 2019).

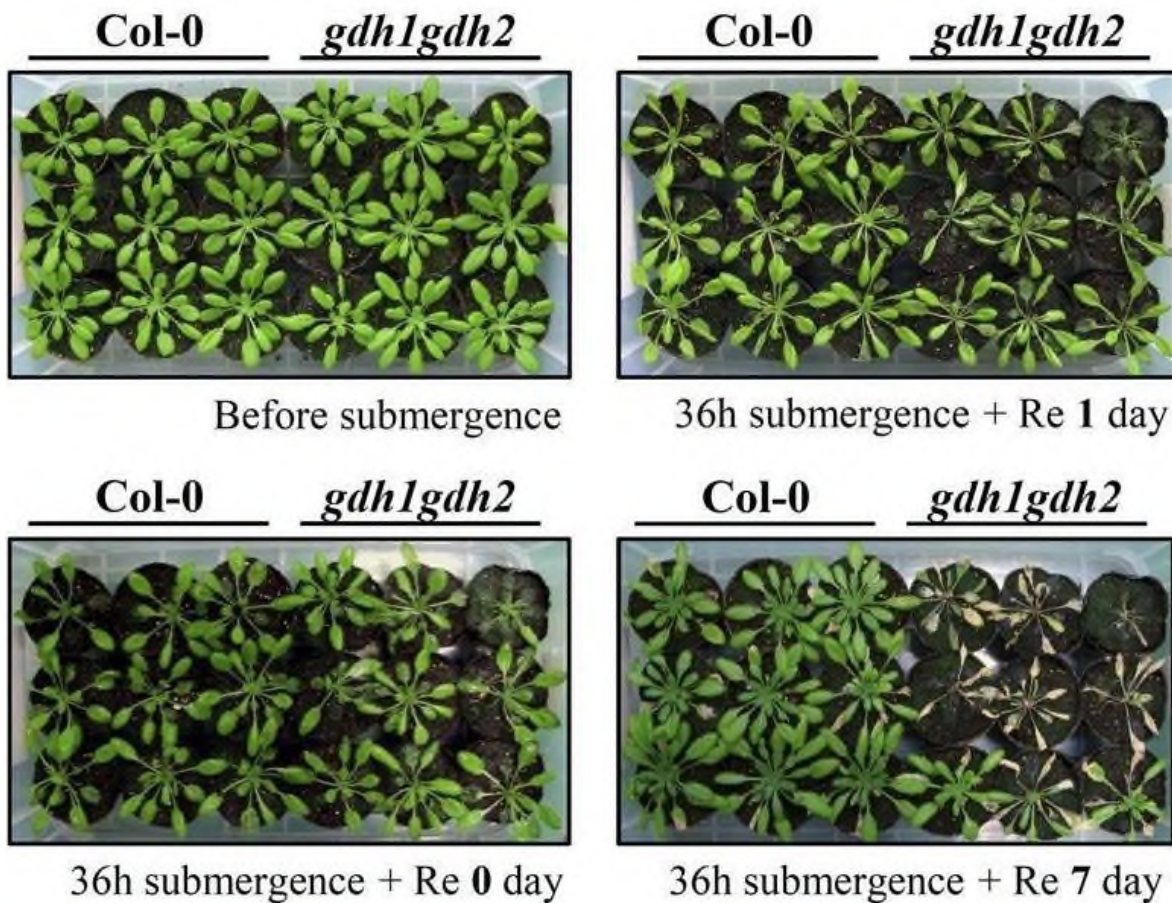
Simultáneamente, se desencadena una cascada de señalización encabezada por los ERFs que funcionan como transductores de señales hormonales (Bailey-Serres *et al.*, 2012; Voesenek *et al.*, 2016) al translocarse del citoplasma al núcleo para transcribir a los genes centrales de hipoxia (GCH). Entre estos genes, se pueden encontrar a los que codifican para las enzimas cruciales del metabolismo fermentativo como alcohol deshidrogenasa (ADH), piruvato descarboxilasa (PDC) y alanina amino transferasa (ALAT). En conjunto, estas enzimas permiten el cambio de la ruta de respiración oxidativa mitocondrial al

metabolismo anaeróbico para obtener ATP y NAD<sup>+</sup> vía glucólisis y la fermentación (Voeselek y Bailey-Serres 2015; Fukao *et al.*, 2019).

En 2016, Tsai *et al.* realizaron un estudio de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en *Arabidopsis thaliana* y su relación en la reactivación del ciclo de los ácidos tricarbónicos durante el estrés por inundación. Para ello, desarrollaron mutantes para estudiar su función y encontrar la red de regulación. Antes de ser sumergidas, las plantas mutantes de GDH se observaron con un vigor similar a las plantas silvestres. Sin embargo, después de ser rescatadas de la inundación y con un tiempo de reoxigenación de 0-7 días, las plantas mutantes dobles *gdh1/2* fueron más pequeñas y presentaron cambios diferenciales en la salud de las hojas como deshidratación y amarillamiento en comparación con las silvestres (Figura 6) indicando la importancia del manejo metabólico del estrés.

Tsai *et al.*, (2016) también encontraron también que *GDH1* y *GDH2* se inducen ante la anoxia y en la reoxigenación a través de la señalización de etileno, resaltando el papel de las fitohormonas en la regulación de la respuesta a la inundación. El etileno es el actor principal en la regulación de la respuesta ante un nivel bajo de O<sub>2</sub>, así como en la reoxigenación (Yeung *et al.*, 2019).

El etileno también afecta diferentes etapas del ciclo de vida suprimiendo el crecimiento de las plantas, la germinación de las semillas, acelerando la senescencia y floración (Fukao *et al.*, 2012). Otra hormona de alto interés durante la inundación es el ácido giberélico (GA), responsable de la elongación, del aumento de uso de reservas y la tasa de germinación (Peña-Castro *et al.*, 2011). Durante una inundación, el GA interactúa con el etileno para la regulación de factores génicos. En situaciones como el síndrome de escape, realizan una relación cooperativa, sin embargo, estas relaciones dependen primordialmente de los factores genéticos de las plantas (Fukao y Bailey-Serres, 2008).



**Figura 6:** Respuesta de mutantes *gdh* *Arabidopsis thaliana* ante anoxia y reoxigenación. Comparación de Col-0 y una doble mutante se muestra antes de la inundación y 36h después de la inundación con periodos de reoxigenación de 0 días, 1 día y 7 días (Tsai *et al.*, 2016).

#### 1.4 Homeostasis de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Después de la inundación existe un periodo de recuperación en las plantas en donde se ha registrado que se lleva a cabo el reordenamiento metabólico y la atenuación de los diferentes tipos de estreses secundarios generados. Uno de ellos es la sobreacumulación de ROS mitocondrial y cloroplastídico que afectan seriamente al tejido vegetativo causando lesiones como amarillamiento/clorosis, necrosis y deshidratación (Fukao *et al.*, 2011)

Yeung *et al.* (2018) estudiaron el mecanismo de regulación de ROS encontrando que es mediado por el etileno y el ácido abscísico (ABA) activando la

apertura del estoma y regulando la homeostasis de ROS. Se ha reportado que existe una correlación entre la producción de ROS y la susceptibilidad al estrés oxidativo causado por la inundación (Fukao *et al.*, 2011; Rivera-Contreras *et al.*, 2016) y que la capacidad de eliminar o acumular más ROS está dada por el genotipo. Se ha observado que existen ecotipos de *Arabidopsis thaliana* y *Brachypodium* que presentan una menor acumulación de ROS y generalmente presentan menores efectos de estrés durante la post-inundación (Rivera-Contreras *et al.*, 2016; Yeung *et al.*, 2019).

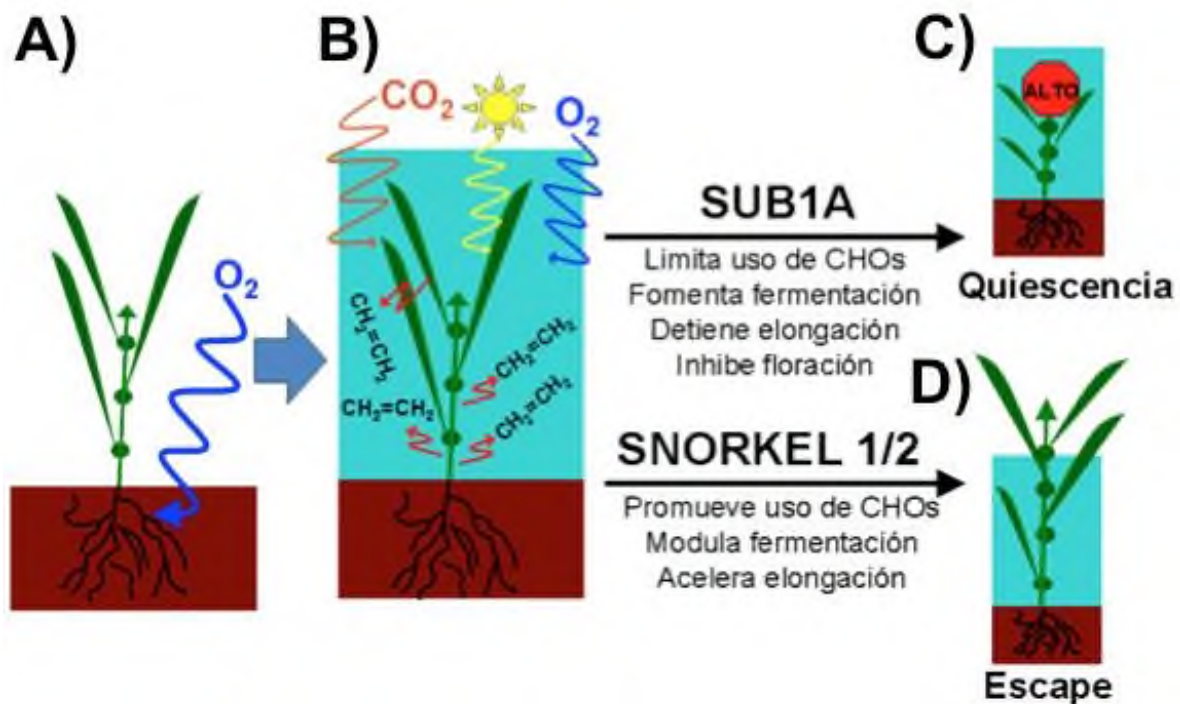
Otro estrés que participa en el periodo de post-inundación es en el fotosistema, que es causado por un aumento en la intensidad lumínica al exponer a la planta a una alta intensidad de luz durante el periodo de recuperación inactivando ambos fotosistemas y dañando los tejidos vegetativos (Juntawong y Bailey-Serres, 2012).

También se ve afectada la permeabilidad de las membranas de raíces, y el funcionamiento de las proteínas encargadas de la difusión hídrica dentro de la planta (acuaporinas) debilitando los tejidos y provocando un estrés por deshidratación, a pesar de que esté saturada de agua (Yeung *et al.*, 2019). Por lo que el tiempo de recuperación y los daños atenuados son claves de la resistencia ante un estrés generado por inundación.

Además de estas respuestas moleculares, hay otras respuestas asociadas al crecimiento en las plantas que de manera natural no presentan una adaptación a los ambientes acuáticos. Se han descrito dos mecanismos moleculares para administrar de manera eficiente las reservas de carbohidratos durante un estrés hídrico (Figura 7). El primer mecanismo se ha nombrado quiescencia (del latín *quiescere*, estar quieto) que funciona limitando el uso de las reservas de carbohidratos de almidón, sacarosa y otros azúcares libres a un mínimo para mantener las funciones vitales más esenciales (Fukao *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Esto ocasiona que la planta detenga su elongación (Fukao *et al.*, 2006), retrase su floración (Peña-Castro *et al.*, 2011) y permanezca en un estado de espera para que la inundación desaparezca y entonces reiniciar el crecimiento. Se ha encontrado

que generalmente el mecanismo de quiescencia se encuentra en plantas que sufren inundaciones eventuales y profundas, y frecuentemente es el caso de las plantas de cultivo (Pucciariello y Peralta 2013; Peña-Castro 2014).

El segundo mecanismo se ha nombrado síndrome de escape, y consiste en movilizar las reservas de carbohidratos y dirigir el flujo energético hacia la elongación de la parte aérea para escapar lo más rápido posible de la inundación, al exponer las hojas al aire y así facilitar la difusión del  $O_2$ . El síndrome de escape es útil en las plantas que enfrentan inundaciones constantes, pero de baja profundidad, por ejemplo, algunas variedades especializadas de arroz (Pucciariello y Peralta 2013).



**Figura 7:** Mecanismos de respuestas de las plantas a la inundación. La quiescencia limita los recursos de sus carbohidratos, mientras pasa el fenómeno de inundación, se observa en inundaciones que se presentan en periodos cortos. Por otra parte, el síndrome de escape utiliza sus reservas energéticas para elongar sus partes aéreas y se observa cuando las inundaciones son frecuentes y por periodos largos. (Peña-Castro *et al.*, 2014).

Algunos de estos descubrimientos han permitido el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas agrícolas para atenuar los efectos económicos de las inundaciones. Los loci en el arroz responsables del control de la respuesta quiescente (SUBMERGENCE1, SUB1), de la elongación (SNORKEL, SK) y de la fermentación de alanina (qAG-9-2) han permitido que, en países asiáticos, se mejoren diferentes variedades no transgénicas de arroz, aumentando la tasa de rendimiento después de tolerar una inundación (Dar *et al.*, 2018). En la cebada (*Hordeum vulgare* L.), un cultivo que enfrenta anegamientos, los mutantes de la ruta N-terminal que controla la expresión de los ERFs, presentan un aumento a la tolerancia al anegamiento (Mendiondo *et al.*, 2015).

## 1.5 Regulación de los ciclos circadianos en inundación

Naturalmente, las plantas poseen receptores que les permiten coordinar sus funciones biológicas principales y mantener un equilibrio entre los ciclos naturales de día y noche. Para ello, es necesaria la respuesta a señales externas a través del ciclo circadiano que debe ser flexible para responder dependiendo de las condiciones ambientales que se presenten (Nohales y Key, 2016).

De esta forma, el ciclo circadiano es un mecanismo para que las plantas anticipen eventos como el amanecer y ajusten sus programas transcripcionales, presentando oscilaciones diferenciales de expresión de múltiples genes durante la primera y la última mitad de la noche y el día (Webb *et al.*, 2019). Estas respuestas son moduladas por los metabolitos como azúcares y el nitrógeno disponible, que funcionan como reguladores endógenos contribuyendo a la homeostasis (Ohara *et al.*, 2018). En *Arabidopsis thaliana* se ha logrado identificar que el ciclo circadiano regula procesos importantes relacionados con el metabolismo, el crecimiento, las respuestas al estrés, la reproducción y puede proporcionar una mayor ventaja competitiva. Cuando el ciclo circadiano está correctamente acoplado a los ciclos de

luz y oscuridad se observa un mayor porcentaje de biomasa en la planta (Seki *et al.*, 2017).

Respecto a la inundación, pocos estudios han explorado el efecto de este estrés en la expresión génica diurna o circadiana. Peña-Castro *et al.*, (2011) demostraron que la inundación altera la expresión de los reguladores de floración *CONSTANS* y *FLOWERING LOCUS T*, tanto en arroz como en *Arabidopsis*, con la consecuencia de un atraso de la floración; ambos genes son productos génicos regulados por el ciclo circadiano. En 2016, Rivera-Contreras *et al.* realizaron un análisis transcriptómico en *Brachypodium distachyon* donde detectaron a genes expresados positivamente (encendidos) y negativamente (apagados) durante el estrés por inmersión. Cuando se midió la expresión de algunos de ellos en oscilaciones activas del ciclo circadiano durante las primeras 12 horas de inmersión, se detectó que su oscilación cambió ante el estrés y también fue diferencial entre ecotipos tolerantes y sensibles. Algunos de los genes que perdieron su oscilación normal bajo inundación fueron amilasa, oxidasa alternativa, triacilglicerol lipasa y ERFs, Este trabajo también indicó que el ciclo circadiano es afectado por el estrés por inundación con consecuencias y aplicaciones que aún están por investigarse en rutas metabólicas de manejo de almidón, ácidos grasos y ROS.

Algo que ha podido ocultar los efectos del ciclo circadiano en la inundación es que el estado actual del conocimiento sobre la respuesta molecular que se lleva a cabo en las plantas ha sido probado en condiciones experimentales de ciclos de luz nulos (oscuridad). En los pocos trabajos donde se ha caracterizado la inundación en ciclos de luz, se han seguido pocos genes (Peña-Castro *et al.*, 2011) o sólo durante periodos parciales de luz/oscuridad (Rivera-Contreras *et al.*, 2016)

Por lo anterior, el presente trabajo estuvo enfocado en generar nuevo conocimiento analizando los genes expresados de dos ecotipos estadísticamente contrastantes Bd-21 (sensible) y Bd21-3 (tolerante) durante todo un día en tiempos específicos a lo largo del ciclo diurno. Esto permitió analizar cuáles genes se expresaron a lo largo del día, y su oscilación con respecto al tiempo. Con esta información se pudo elaborar una agrupación de genes significativos relacionados

con las respuestas moleculares de la planta y proponer mecanismos de respuesta. Desde el punto de vista biotecnológico, se podrán identificar nuevos promotores que serían utilizados para diseñar patrones de expresión diferentes en cultivos de interés y brindarles características que sean de utilidad para la sociedad, como una mayor tolerancia a las inundaciones o mayor producción de biomasa.

## 2. Justificación

El cambio climático global ha provocado cambios en los patrones de precipitaciones e inundaciones generando múltiples pérdidas económicas en cultivos, infraestructura y una desestabilización económica en las zonas afectadas. Dado que México es propenso a sufrir precipitaciones frecuentes por la zona intertropical en la que se sitúa, se han desarrollado políticas, como la aplicación de seguros y seguimiento meteorológico para contrarrestar los efectos negativos de estos fenómenos hidrometeorológicos y así evitar situaciones que comprometan la economía del país y el desabasto de productos alimenticios. Sin embargo, es necesario investigar e implementar seguros genéticos a la productividad agrícola con base en el conocimiento molecular de la respuesta natural de las plantas al exceso de agua.

Actualmente, está disponible un solo cultivar tolerante a la inundación, el arroz SUB1, que se usa extensamente en el sureste asiático. De tal manera, existen amplias posibilidades de utilizar más mecanismos para lograr metas similares en plantas que no están necesariamente adaptadas a la inundación. Con el objetivo de generar conocimiento con base en nuevos patrones de expresión bajo condiciones similares a las que se generan durante una inundación en el medio natural, es necesario hacer estudios que nos sirvan para entender los mecanismos que se expresan cuando una planta se encuentra en estrés por inundación durante un ciclo diurno.

Por ello, en este trabajo se realizó un análisis transcriptómico en ecotipos de la planta modelo monocotiledónea *Brachypodium distachyon* pues facilita el estudio de los mecanismos implicados y la identificación de los genes candidatos a participar en la tolerancia ante el estrés. El estudio se hizo en plantas inundadas bajo el efecto del ciclo diurno normal para obtener mayor conocimiento de mecanismos de tolerancia de expresión durante horas específicas del día. Adicionalmente a esta exploración, se utilizaron genotipos de tolerancia

contrastante para determinar cuáles de los cambios podrían estar asociados a una mayor o menor tolerancia al estrés.

La identificación de nuevos mecanismos podría permitir encontrar una estrategia que en un futuro sirva para explorar biotecnológicamente genes y rutas metabólicas, y trasladarlas a cultivos superiores.

### **3. HIPÓTESIS**

Los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd-21 y Bd21-3 expresarán transcritos relacionados con la sumersión en función del ciclo diurno.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

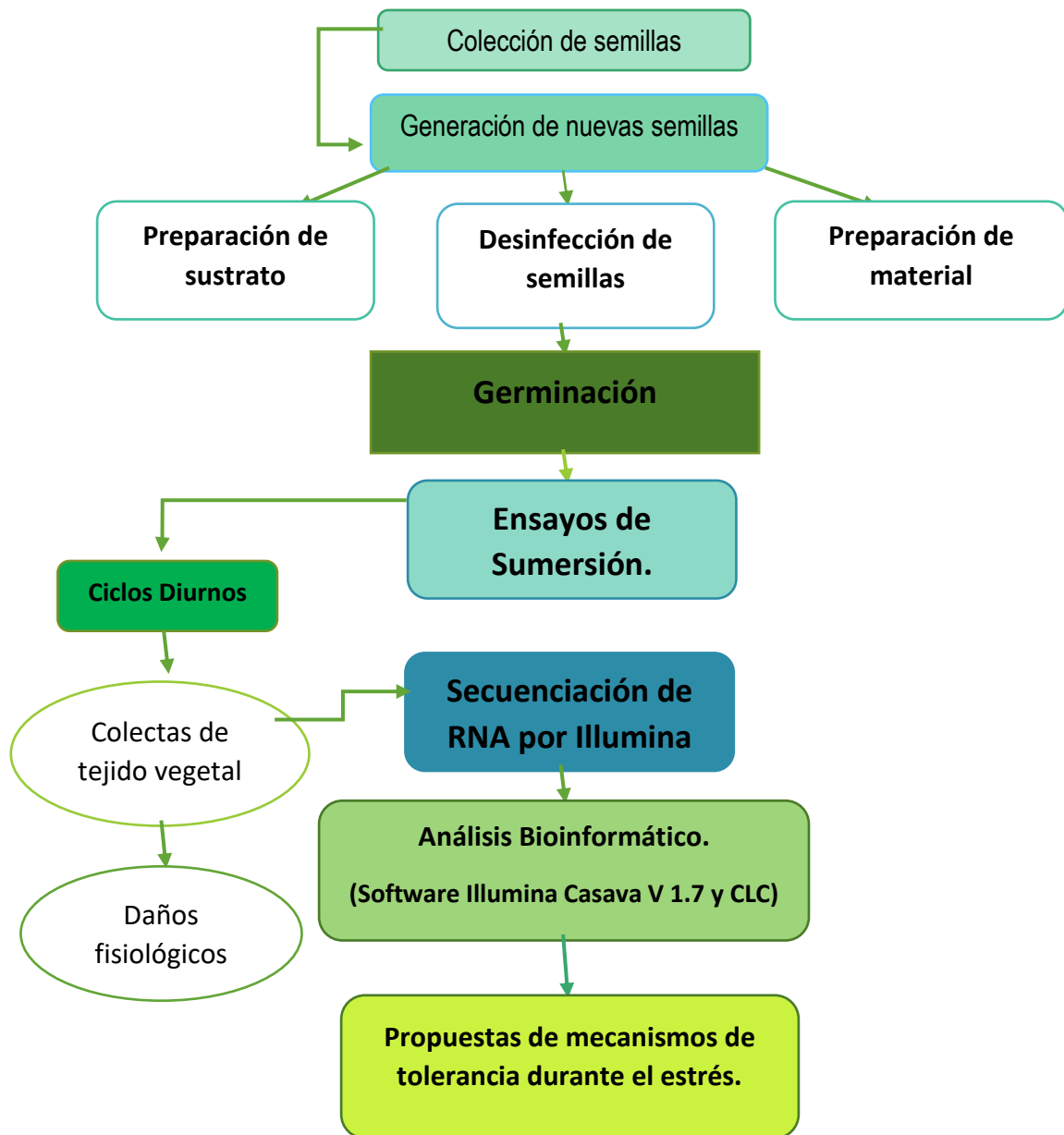
Evaluar los cambios de expresión génica durante el ciclo diurno bajo condiciones de estrés por sumersión en los ecotipos Bd-21 y Bd21-3.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- I. Realizar ensayos de sumersión y cuantificar los daños en los ecotipos Bd-21 y Bd21-3
- II. Contrastar la expresión génica y molecular de los ecotipos de Bd-21 y Bd21-3 a través de RNA-seq
- III. Realizar un análisis bioinformático de la regulación génica durante el ciclo diurno de los ecotipos Bd21-3 y Bd-21

Agrupar a los genes por intensidad de expresión, constancia de expresión, cambios en la oscilación y función biológica.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 8:** Estrategia experimental desarrollada en el presente proyecto.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material Vegetal

Se emplearon semillas de *Brachypodium distachyon* ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, y originalmente donadas por el Dr. Gavin a través del departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA-ARS, CA). Previamente, a través de ensayos de tolerancia a la sumersión, se realizó la caracterización de los ecotipos, seleccionando a Bd21-3 como tolerancia superior, Bd2-3 como tolerancia media y Bd-21 como sensible. (Rivera-Contreras *et al.*, 2016; Martínez, 2018).

### 6.2 Establecimiento y germinación de *Brachypodium distachyon*

Para el establecimiento de los diferentes ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21 se realizó la desinfección de las semillas colocando aproximadamente 100 semillas en un tubo de 50 ml y se agregaron 40 ml de solución de hipoclorito de sodio al 1.6%. Se agitaron en un oscilador durante 5 min y se realizaron 4 ciclos de enjuague con 50 ml de agua destilada estéril y agitación durante 1 min. Se agregaron 45ml de agua destilada estéril, se envolvieron los tubos con papel aluminio y se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4°C durante 5 d en oscuridad para romper la dormancia y sincronizar su germinación.

La geminación de las semillas se realizó en una mezcla de sustrato Cosmopeat y perlita (en proporción 3:1) previamente esterilizado (121°C / 15 psi, durante 1 h), y posteriormente a temperatura ambiente, se adicionó fertilizante Nitrofosca (relación NPK 15-15-20) en una proporción 16.4 g de fertilizante por cada 4 L de mezcla de sustrato (equivalente a 2% p/p).

Se utilizaron macetas pequeñas de una capacidad de 150 mL debidamente rotuladas con el ecotipo, la fecha de siembra y el tiempo que fueron estresadas. Se

les agregó la mezcla de sustrato preparado, y con ayuda de unas pinzas metálicas se introdujeron 5 semillas por maceta dejando visible el asta esperando su germinación en 4-5 d.

Las plántulas crecieron en el cuarto de crecimiento vegetal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, con las siguientes condiciones: 16 h luz/ 8 h oscuridad con una intensidad lumínica de 150-180  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 60% humedad,  $23\pm 2$  °C de temperatura ambiente y riego con agua potable filtrada cada 2 d.

### **6.3 Colecta de la primera generación de semillas**

Se sembró una primera línea de crianza de los ecotipos de Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21 de *Brachypodium distachyon* en 63 macetas por ecotipo y se mantuvieron en una cámara de crecimiento vegetal (Adaptis, Conviron) con las mismas condiciones antes descritas, durante 4 meses hasta su floración y posterior cosecha. Una vez que las plantas concluyeron su ciclo de vida y se tornan de un color amarillo, indicador de que se puede cosechar las semillas, se cortó la espiga y se retiró la cascara que cubre a la semilla. Las semillas se almacenaron en sobres de papel debidamente rotulados (ecotipo, fecha de siembra, fecha de cosecha, número de semillas y personal responsable) hasta su uso.

### **6.4 Ensayos de sumersión**

Se utilizaron las semillas de la primera generación de crianza siguiendo el protocolo de establecimiento y germinación previamente descrito, pero con un paso adicional antes del llenado de las macetas, que fue colocar una cama de piedras en el fondo para brindar mayor peso y estabilidad (Figura 9A). Posteriormente, se llenaron las macetas con la mezcla de sustrato previamente preparado y esterilizado (Figura 9B) y se sembraron las semillas de cada ecotipo, esperando su germinación (Figura 9C). Una semana previa a que las plantas cumplieran los 15 d de edad (~8d

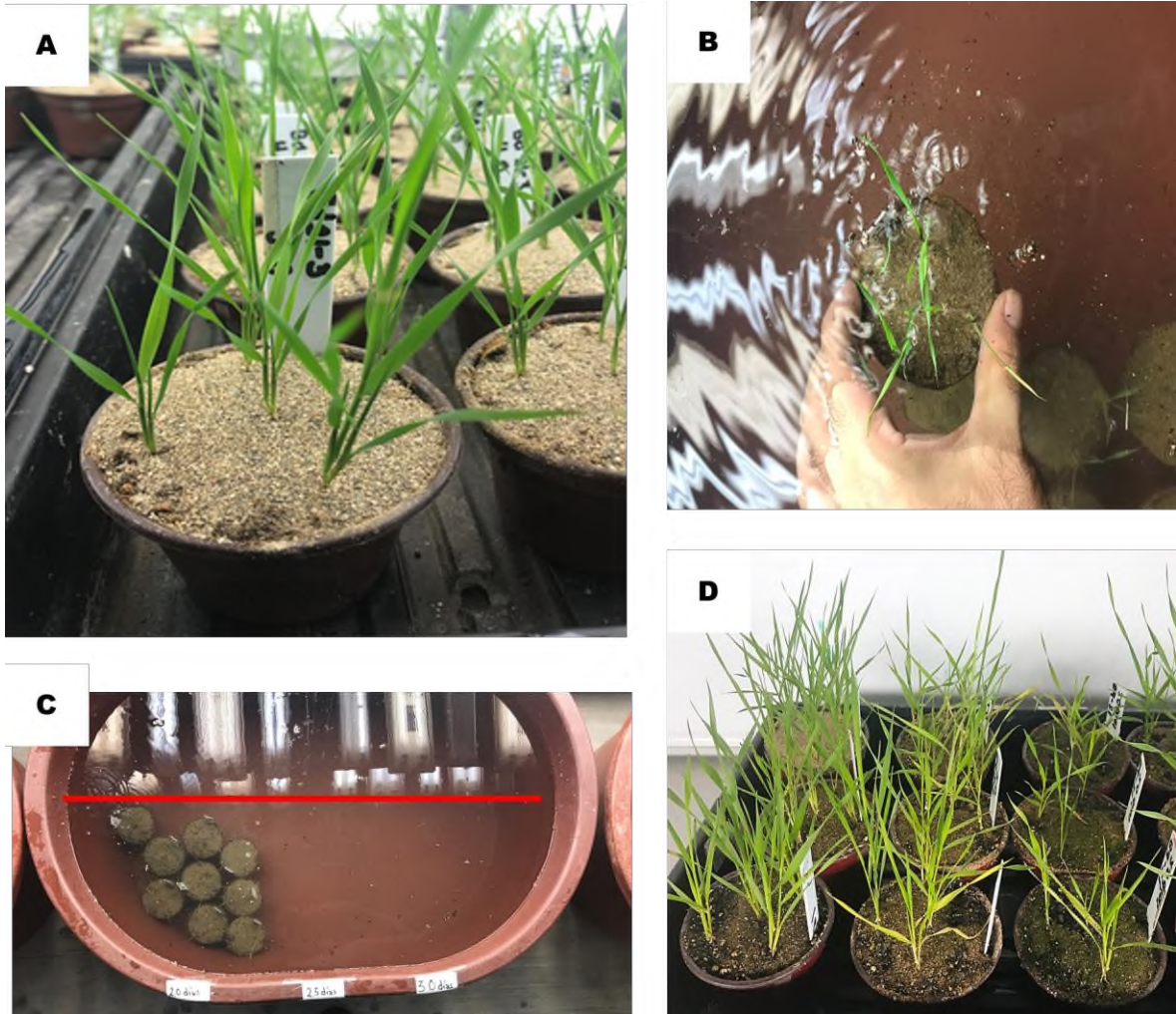
de edad), se les colocó a las macetas una cama de arena tamizada en la superficie para evitar la erosión del sustrato al sumergirlas (Figura 10A). Un día previo al inicio del ensayo de sumersión, se realizó el llenado de las tinas opacas con capacidad de 110 L con agua potable filtrada hasta aproximadamente los 30cm de profundidad.



**Figura 9:** Procedimiento de llenado de macetas para brindarles mayor estabilidad. **A)** Se le coloca una cama de piedras pequeñas en el fondo de la maceta, **B)** Se rellena con mezcla de sustrato previamente esterilizado compactándolo de manera uniforme y **C)** Se siembran 5 semillas por ecotipo en cada maceta y se espera de 4-5 d de germinación.

Las macetas con plantas de 15 d de edad se ingresaron a las tinas en un arreglo aleatorio 3h antes del inicio de la obscuridad (ZT13; Figura 10B y C). Se colocaron dos tipos de controles sin sumersión, uno que creció de manera normal (CCN) con una intensidad lumínica de  $150-180 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  y otro con una intensidad lumínica de  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (CBL) a un lado de las tinas de sumersión.

Una vez transcurrido el tiempo de estrés por sumersión deseado (indicado en cada figura correspondientes) se extrajeron las macetas de las tinas cuidadosamente y se colocaron en charolas donde crecieron paralelamente con sus controles nuevamente en condiciones normales de intensidad lumínica (Figura 10C). A los 6d se tomaron las mediciones de daños fisiológicos causados en hojas. Todos los ensayos de sumersión se realizaron en el cuarto de crecimiento vegetal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec con las condiciones antes mencionadas.



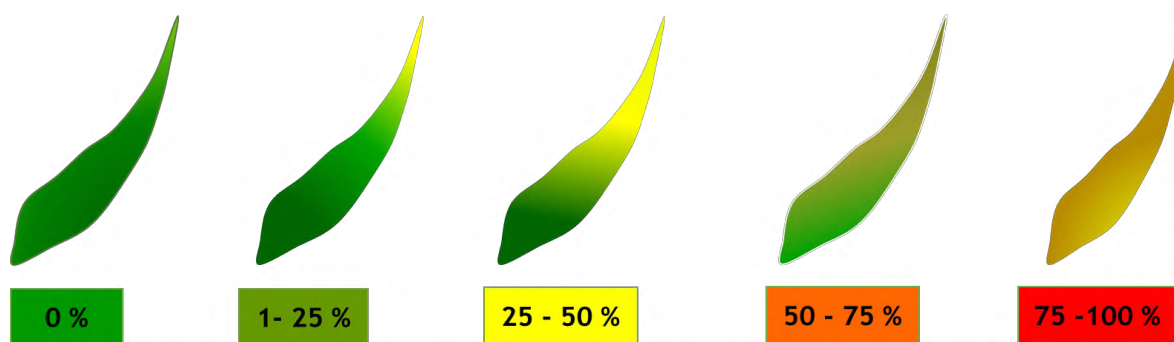
**Figura 10:** Técnica de ensayos de sumersión. **A)** *Brachypodium distachyon* ecotipo Bd21-3 con 14 d de edad un día previo a la sumersión **B)** Introducción de macetas en las tinas de ensayos de sumersión, **C)** Área delimitada para la colocación de macetas de los tres ecotipos con indicadores de tiempo de estrés donde reciben una intensidad lumínica de  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , **D)** Rescate y recuperación de los ecotipos.

## 6.5 Análisis estadístico

Se usaron tres experimentos independientes de sumersión y se tomó como variable de respuesta la supervivencia, o el porcentaje de senescencia de hojas (descrito en la siguiente sección). Las plantas se colocaron en los tanques como se describió en la sección anterior de forma totalmente aleatoria. Los factores fueron los días que en que se rescataron las plantas del estrés (0.5-3 d, cada medio día). Los datos se analizaron con el software estadístico Minitab 2019. Para comparar los datos de porcentaje de supervivencia se realizó un análisis de variancia (ANOVA), modelo lineal general y posteriormente se realizó la prueba de Tukey ( $p > 0.05$ ).

## 6.6 Datos fisiológicos de daño en hojas

A los 15 d se contó el número de hojas por planta. Después del estrés generado por sumersión y pasados los 6 d de recuperación, se tomó el número de hojas dañadas, así como el porcentaje de daño 0%, 1-25%, 25-50%, 50-75% y 75-100% (Figura 11). Junto con la toma de datos todos los ecotipos en sus diferentes tiempos de estrés se fotografiaron individualmente y en grupo.



**Figura 11:** Índice para agrupar el porcentaje dañado de las hojas después del tiempo de recuperación ante el estrés generado por sumersión.

## **6.7 Ensayo de sumersión para la colecta de RNA y secuenciación**

Para la extracción de RNA se realizó un ensayo de sumersión independiente en donde se emplearon los ecotipos Bd21-3 y Bd-21 con un total de 270 plantas por ecotipo, y se crecieron en las mismas condiciones como se describió previamente. Dado que los tejidos serían destruidos durante la extracción, se colocaron plantas en exceso como testigos para confirmar que el estrés fuera de la misma magnitud que en los experimentos anteriores.

Se colectó por triplicado el tejido aéreo vegetal de 5 individuos, todas en un arreglo aleatorio en los tanques. Las plantas se inundaron 3h antes del anochecer y pasadas 11h de estrés por sumersión, se colectaron las muestras en los tiempos ZT0, ZT8, ZT16, ZT20 y en ZT 24 (el siguiente ZT0). En paralelo, se colocaron y colectaron en los mismos tiempos ZT controles de crecimiento normal (CCN) para verificar la expresión en condiciones sin el disturbio del descenso de luminosidad, y controles de baja luz (CBL) para usarlos como la condición contrastante principal no inundada; todos también en triplicado (Figura 12).



Inmediatamente después de rescatar las plantas, se colectó el tejido vegetal aéreo, se secó rápidamente y se envolvió en papel aluminio debidamente identificado (ecotipo, condición, muestra y tiempo de colecta), se congeló utilizando nitrógeno líquido y se almacenó en bolsas individuales, a -80°C en un ultracongelador (Thermo Scientific 900 series) hasta su uso. Todas las muestras se codificaron para un fácil manejo (Tabla 1).

**Tabla 1:** Codificación de las 90 muestras colectadas, para facilitar su manejo. CCN (Control de crecimiento Normal) y CBL (Control de Baja Luz).

Ecotipo	Condición	Tiempo de colecta	Réplica	Codificación
Bd-21	CCN	0 h	1	1
Bd-21	CCN	0 h	2	2
Bd-21	CCN	0 h	3	3
Bd-21	CBL	0 h	1	4
Bd-21	CBL	0 h	2	5
Bd-21	CBL	0 h	3	6
Bd-21	Inundada	0 h	1	7
Bd-21	Inundada	0 h	2	8
Bd-21	Inundada	0 h	3	9
Bd21-3	CCN	0 h	1	10
Bd21-3	CCN	0 h	2	11
Bd21-3	CCN	0 h	3	12
Bd21-3	CBL	0 h	1	13
Bd21-3	CBL	0 h	2	14
Bd21-3	CBL	0 h	3	15
Bd21-3	Inundada	0 h	1	16
Bd21-3	Inundada	0 h	2	17

Bd21-3	Inundada	0 h	3	18
Bd-21	CCN	8 h	1	19
Bd-21	CCN	8 h	2	20
Bd-21	CCN	8 h	3	21
Bd-21	CBL	8 h	1	22
Bd-21	CBL	8 h	2	23
Bd-21	CBL	8 h	3	24
Bd-21	Inundada	8 h	1	25
Bd-21	Inundada	8 h	2	26
Bd-21	Inundada	8 h	3	27
Bd21-3	CCN	8 h	1	28
Bd21-3	CCN	8 h	2	29
Bd21-3	CCN	8 h	3	30
Bd21-3	CBL	8 h	1	31
Bd21-3	CBL	8 h	2	32
Bd21-3	CBL	8 h	3	33
Bd21-3	Inundada	8 h	1	34
Bd21-3	Inundada	8 h	2	35
Bd21-3	Inundada	8 h	3	36
Bd-21	CCN	16 h	1	37
Bd-21	CCN	16 h	2	38
Bd-21	CCN	16 h	3	39
Bd-21	CBL	16 h	1	40
Bd-21	CBL	16 h	2	41
Bd-21	CBL	16 h	3	42
Bd-21	Inundada	16 h	1	43
Bd-21	Inundada	16 h	2	44
Bd-21	Inundada	16 h	3	45
Bd21-3	CCN	16 h	1	46
Bd21-3	CCN	16 h	2	47

Bd21-3	CCN	16 h	3	48
Bd21-3	CBL	16 h	1	49
Bd21-3	CBL	16 h	2	50
Bd21-3	CBL	16 h	3	51
Bd21-3	Inundada	16 h	1	52
Bd21-3	Inundada	16 h	2	53
Bd21-3	Inundada	16 h	3	54
Bd-21	CCN	20 h	1	55
Bd-21	CCN	20 h	2	56
Bd-21	CCN	20 h	3	57
Bd-21	CBL	20 h	1	58
Bd-21	CBL	20 h	2	59
Bd-21	CBL	20 h	3	60
Bd-21	Inundada	20 h	1	61
Bd-21	Inundada	20 h	2	62
Bd-21	Inundada	20 h	3	63
Bd21-3	CCN	20 h	1	64
Bd21-3	CCN	20 h	2	65
Bd21-3	CCN	20 h	3	66
Bd21-3	CBL	20 h	1	67
Bd21-3	CBL	20 h	2	68
Bd21-3	CBL	20 h	3	69
Bd21-3	Inundada	20 h	1	70
Bd21-3	Inundada	20 h	2	71
Bd21-3	Inundada	20 h	3	72
Bd-21	CCN	24 h	1	73
Bd-21	CCN	24 h	2	74
Bd-21	CCN	24 h	3	75
Bd-21	CBL	24 h	1	76
Bd-21	CBL	24 h	2	77

Bd-21	CBL	24 h	3	78
Bd-21	Inundada	24 h	1	79
Bd-21	Inundada	24 h	2	80
Bd-21	Inundada	24 h	3	81
Bd21-3	CCN	24 h	1	82
Bd21-3	CCN	24 h	2	83
Bd21-3	CCN	24 h	3	84
Bd21-3	CBL	24 h	1	85
Bd21-3	CBL	24 h	2	86
Bd21-3	CBL	24 h	3	87
Bd21-3	Inundada	24 h	1	88
Bd21-3	Inundada	24 h	2	89
Bd21-3	Inundada	24 h	3	90

## 6.8 Extracción de RNA total

Todas las muestras previamente colectadas se maceraron en morteros fríos con ayuda de nitrógeno líquido, la muestra pulverizada se transfirió a tubos de 1.5 mL previamente identificados y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se transfirieron aproximadamente 100 mg de tejido macerado a un tubo de 1.5 mL nuevo que se utilizó para la extracción de RNA.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó el kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, ZRC202100, ZRC201771) para la extracción de RNA total. Brevemente, a cada una de las muestras se le agregaron 600 µL de TRI Reagent y se llevó al vortex durante 10 s 3 veces para homogenizar la muestra, se centrifugó a 16,000g por 4 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga (Thermo Scientific Heraeus Pico 17). En un tubo limpio se agregaron 600 µl de etanol (Sigma-Aldrich, SHBH1420V) se transfirió el sobrenadante y se agitó. Posteriormente, se transfirió al tubo Zymo spin y se centrifugó a 16,000g por 30 seg. Se eliminó el filtrado colectado y se repitió este paso dos veces. A la columna se le

agregaron 400  $\mu\text{L}$  de RNA Wash Buffer y se centrifugó a 16,000g por 30 seg, posteriormente se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de DNasa y 75 $\mu\text{L}$  de Buffer de digestión de DNA y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reposo, se agregaron 400 $\mu\text{L}$  de Direct-zol RNA Prewash y se centrifugó a 16,000g por 30 seg se desechó el filtrado y se repitió este paso dos veces. Posteriormente se adicionaron 700  $\mu\text{L}$  de RNA Wash Buffer y se centrifugó a 16,000g por 2 min. Se transfirió la columna a un tubo limpio y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNasas/RNasas y se centrifugó a 16,000g por 2 min, todas las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **6.9 Cuantificación de RNA y verificación de integridad**

Las 90 muestras de RNA total se cuantificaron (alícuota de 1.5  $\mu\text{L}$ ) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 200 (Thermo Scientific) y se usó como blanco agua libre de DNasas/RNasas y el modo de cuantificación de RNA. De verificaron las relaciones 260/280 y 260/230, así como que fueran  $\geq 1.8$  y que tuvieran una concentración  $> 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . La integridad del RNA extraído se verificó en gel de agarosa desnaturalizante al 1.5% (con formaldehído al 18%) empleando MOPS 1X como buffer de corrida, y como buffer de carga se empleó una solución de bromuro de etidio, 0.25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol. Los geles se fotografiaron con el fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene Bio Imaging).

Una vez que se verificó la integridad y las concentraciones, las muestras debidamente identificadas se transportaron en un tanque de nitrógeno líquido al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional para su secuenciación.

## 6.10 Secuenciación RNA-seq utilizando la plataforma HiSeq Illumina.

La secuenciación se realizó como un servicio en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Laboratorio de Servicios Genómicos (LABSERGEN) a cargo de la Q. María Guadalupe de Jesús Mireles Rivera. Se analizó la calidad del RNA mediante la cuantificación del número RIN en un Bionanalyzer. Se construyeron 90 bibliotecas de cDNA que correspondieron a los ecotipos Bd21-3 tolerante y Bd-21 sensible en condiciones CCN (Control Crecimiento Normal), CBL (Control Crecimiento de Baja luz) y las colectas de los tiempos ZT0, ZT8, ZT16, ZT20 y ZT24. Se secuenciaron por síntesis con el sistema Illumina NextSeq en formato de 1x100, para generar 20 millones de lecturas sencillas por biblioteca.

## 6.11 Análisis Bioinformático

Para el análisis bioinformático se utilizó la estación de cómputo de última generación (iMac 3.3GHz, i7 quad core 4.0 GHz, 3TB, 32 GB RAM, 4GB video) en conjunto con el software CLC Genomic Workbench (Qiagen V. 18). A partir de las bibliotecas obtenidas del servicio de secuenciación Illumina, se utilizaron bibliotecas con un número mínimo de lecturas  $\geq 15$  millones y que cada biblioteca presentara un porcentaje de mapeo  $\geq 95\%$ . Posteriormente, se descargó la secuencia genómica de *Brachypodium distachyon* ecotipo Bd21-3 V.3.1 disponible en Phytozome V.12.1. Dentro de la interfaz del software, se realizó una tabla de metadatos para la identificación de cada una de las muestras secuenciadas y se procedió a realizar el análisis de RNA-seq. Para la cuantificación de los niveles de expresión génica se realizó el análisis de expresión diferencial (DE) y se obtuvieron las tablas de Browser normalizadas en lecturas por kilobase de transcrito RPKM (read per kilobase per million) para agregar una capa de normalización por longitud.

Con el objetivo de comprender los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta al estrés por sumersión, se realizó el análisis de Ontología Genética

(GO; Carbon *et al.*, 2009)). Para lo anterior el valor de  $\text{Log}_2$  (fold change) se empleó para formar dos grupos, genes expresados positivamente  $\text{Log}_2 \geq 1.5$  (regulado hacia arriba) o negativamente  $\text{Log}_2 \leq -1.5$ , y se consideraron genes sobre expresados o reprimidos respectivamente. En seguida, se combinó con un filtro para la columna FDR p-value con un valor de  $\leq 0.00005$ . Lo anterior se realizó para cada una de las cinco colectas (ZT0h, ZT8h, ZT16h, ZT20h, y ZT24h) por separado. Una vez agrupadas las listas de genes fueron ingresadas en la página de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) a la herramienta PhytoMine, para obtener un listado de la ontología genética (GO) del grupo de interés y se seleccionó un valor  $p \leq 0.05$ , agrupando en la categoría de Procesos biológicos (Biological Process).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Línea uno de crianza

Los dos primeros experimentos de este trabajo tuvieron el fin de cosechar semillas de los tres ecotipos que se estudiaron: Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21. Se obtuvieron aproximadamente 1500 semillas por ecotipo que fueron suficientes para realizar ensayos de sumersión y de análisis transcriptómico. En la tabla 2, se observa el porcentaje de germinación de cada ecotipo que sirvió para calcular el número de semillas a sembrar en los subsecuentes experimentos.

**Tabla 2:** Porcentajes de germinación de las semillas de los tres ecotipos sembrados en la primera línea de crianza Bd-21, Bd2-3 y Bd21-3.

Ecotipo	Porcentaje de Germinación %
Bd21-3	96.1%
Bd2-3	86.1%
Bd-21	72.2%

### 7.2 Ensayos de tolerancia al estrés generado por sumersión completa

En los ensayos realizados por Rivera-Contreras *et al.*, (2016) se determinó que el ecotipo Bd-21 de *Brachypodium distachyon* presentó una tolerancia menor ante el estrés generado por sumersión, mientras que el ecotipo Bd2-3 fue clasificado como un ecotipo de tolerancia media. En su momento, Bd2-3 fue usado como un ecotipo tolerante en estudios transcriptómicos debido a que el tiempo de floración era más cercano a Bd-21. Posteriormente, en los ensayos realizados por Martínez (2018) para la búsqueda de un ecotipo que presentara una mayor tolerancia, se incluyó en los estudios al ecotipo Bd21-3 que resultó ser un ecotipo más tolerante ante el estrés por sumersión.

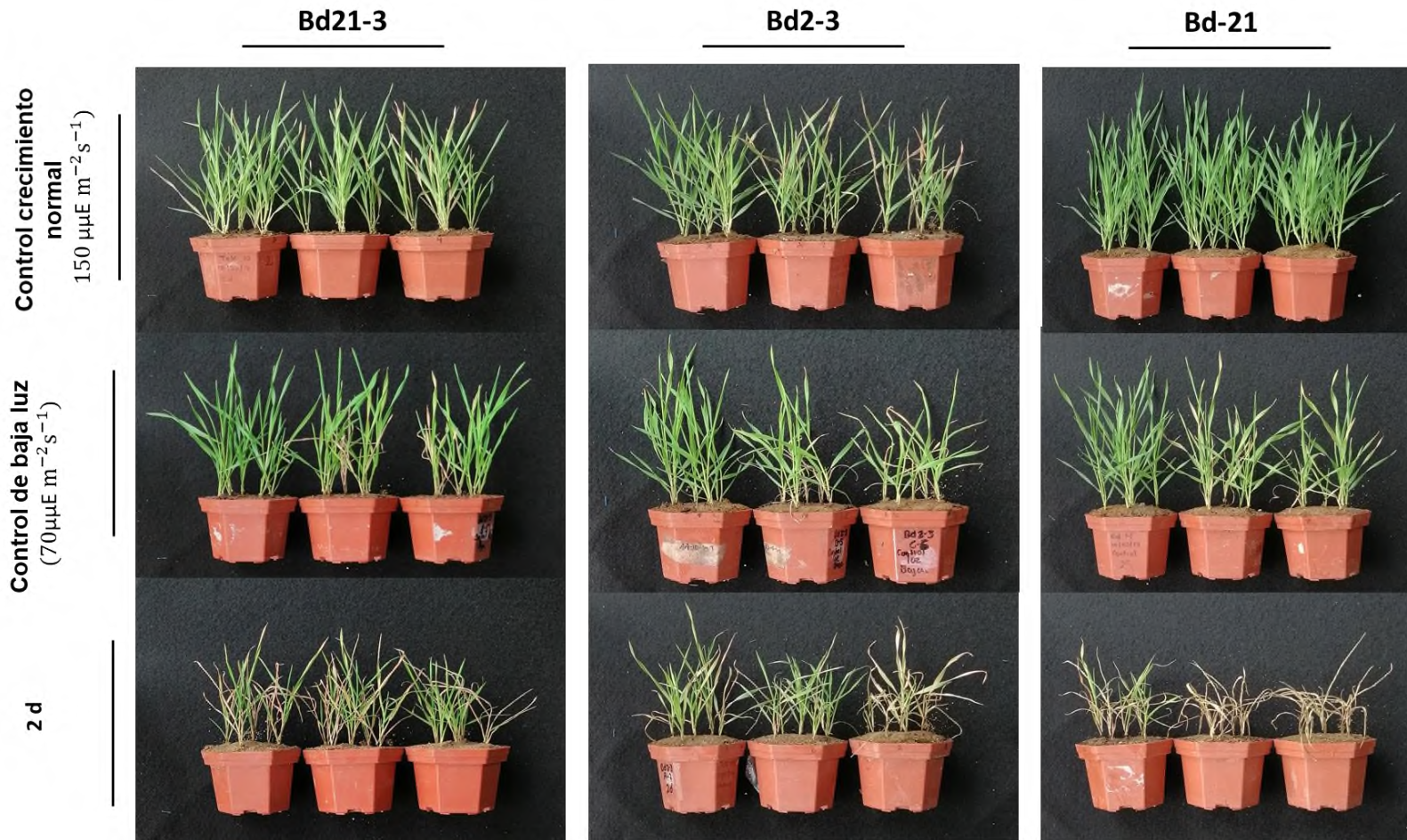
Con estos antecedentes, en el presente trabajo, se realizó un estudio donde se evaluó en conjunto a los ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21 y así poder seleccionar adecuadamente a los ecotipos que presentaran una diferencia contrastante ante el estrés por sumersión y que posteriormente se utilizaron para realizar estudios transcriptómicos.

La examinación visual de las plantas indicó que el ecotipo Bd21-3 presentó mejores características de supervivencia que los otros dos ecotipos (Figura 13 y 14). A partir del 1.5 d, se observó clorosis y en algunas hojas se empezó a observar deshidratación, sin embargo, no se apreció un nivel de daño que comprometiera la supervivencia de las plantas. Fue hasta el 4 d de estrés donde se visualizaron un mayor número de afectaciones en las hojas. Lo anterior coincidió con lo registrado por Martínez (2018) quien reportó que Bd21-3 es el ecotipo que presenta una tolerancia mayor ante el estrés generado por sumersión.

En el ecotipo Bd2-3 se observó que a partir de 3 d de estrés las afectaciones fisiológicas son notables y en algunos casos ya se puede ver comprometida la supervivencia de las plantas. Esto último era esperado pues Rivera-Contreras *et al.* (2016) determinó que el tiempo de tolerancia media para este ecotipo es de 3.4 d de estrés, por lo que en este trabajo fue considerado como un ecotipo de tolerancia media. En lo que respecta al ecotipo Bd-21 se observó que en el tiempo de 2.5 d la afectación a las hojas fue severa, así coincidiendo con lo previamente reportado de que es un ecotipo sensible.



**Figura 13:** Primer ensayo de sumersión de ecotipos de *Brachypodium distachyon*. Se presentan los ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21, por triplicado para cada tiempo de colecta indicado después del estrés generado por sumersión CCN (Control de Crecimiento Normal) más 6 d de post-sumersión.



**Figura 14:** Segundo ensayo de sumersión de ecotipos de *Brachypodium distachyon*. Se presentan los ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21, por triplicado para cada tiempo de colecta indicado después del estrés generado por sumersión CCN (Control de Crecimiento Normal) más 6 d de post-sumersión.

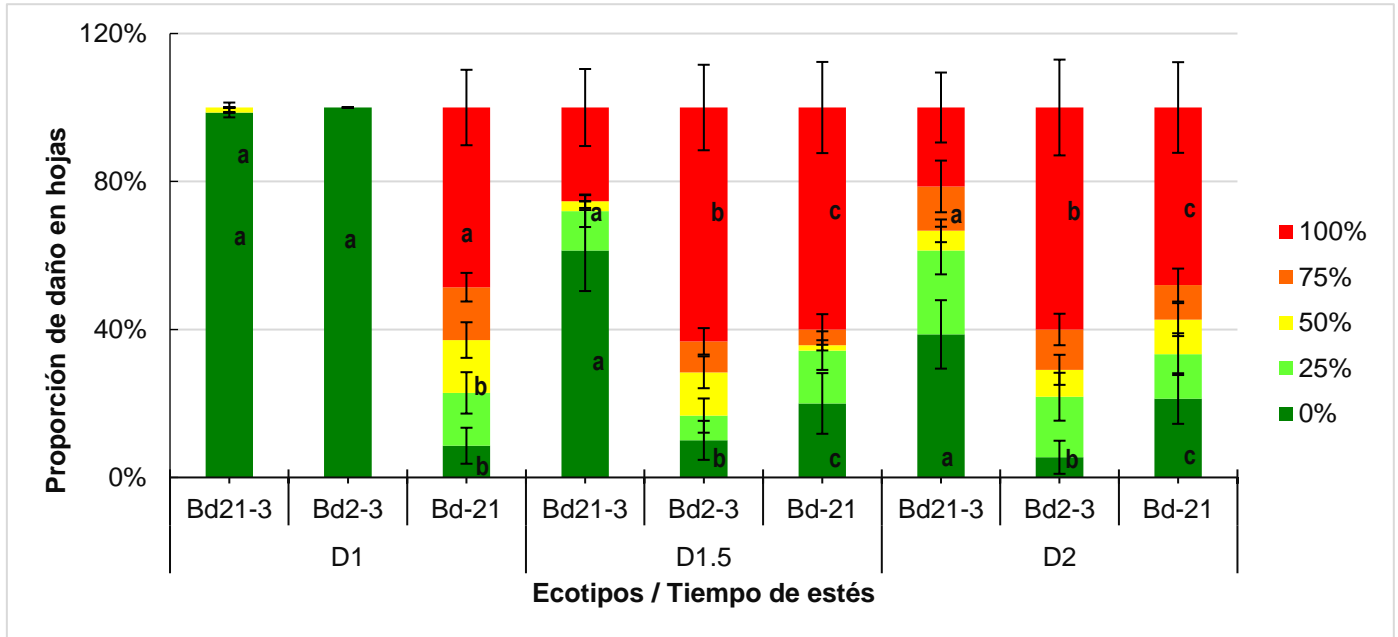
### 7.3 Daños fisiológicos en hojas de *Brachypodium distachyon*

En el examen visual de los resultados de los ensayos de sumersión se apreció que existe una diferencia entre la incidencia de daños en los tres diferentes ecotipos. Uno de los primeros síntomas es el amarillamiento o mejor conocido como clorosis de las hojas, este tipo de daño se manifiesta empezando por la parte superior de la hoja continuando hacia la mitad y finalizando en la parte inferior de la hoja, completando así un 100% de daño. En casos más severos se presentó una deshidratación de las hojas, observando una coloración verde opaco o totalmente café. Ambos síntomas se han reportado previamente como de aparición gradual en *Brachypodium distachyon* (Rivera-Contreras *et al.*, 2017). Sin embargo, no se desarrolló un método para cuantificar estas observaciones.

Recientemente, Tsai *et al.* (2016) propusieron un índice de daño en hojas de *Arabidopsis thaliana*. En el presente trabajo se adaptó dicho índice de daño a la arquitectura y fisiología de *Brachypodium distachyon* mediante la clasificación de diferentes proporciones de daño en un rango de 0% al 100% (Figura 11). Al graficarse este índice en función del tiempo de estrés por sumersión, se facilitó la clasificación cuantitativa de las proporciones de daño causado en las hojas (Figura 16).

La tolerancia a la sumersión se logró determinar después de un periodo de recuperación post-sumersión en donde las hojas de la planta sirvieron como indicador de la tolerancia. Las hojas más viejas presentaron una mayor vulnerabilidad a la deshidratación, amarillamiento, necrosis y en casos extremos la muerte de la hoja. La aplicación de la adaptación del índice de daño de *Arabidopsis thaliana* en *Brachypodium distachyon* permitió cuantificar ver que en el tiempo de 1d + 6r (1 d de estrés y 6 d de recuperación) el índice de daño discriminó estadísticamente al ecotipo Bd-21 como sensible en todas las categorías de daño. En los días 1.5 y 2 + 6r se observó que el índice de daño puede determinar a Bd21-

3 como un ecotipo tolerante al presentar diferencias estadísticas respecto a hojas intactas (daño 0%) y daño total de (100%) con los otros dos ecotipos.

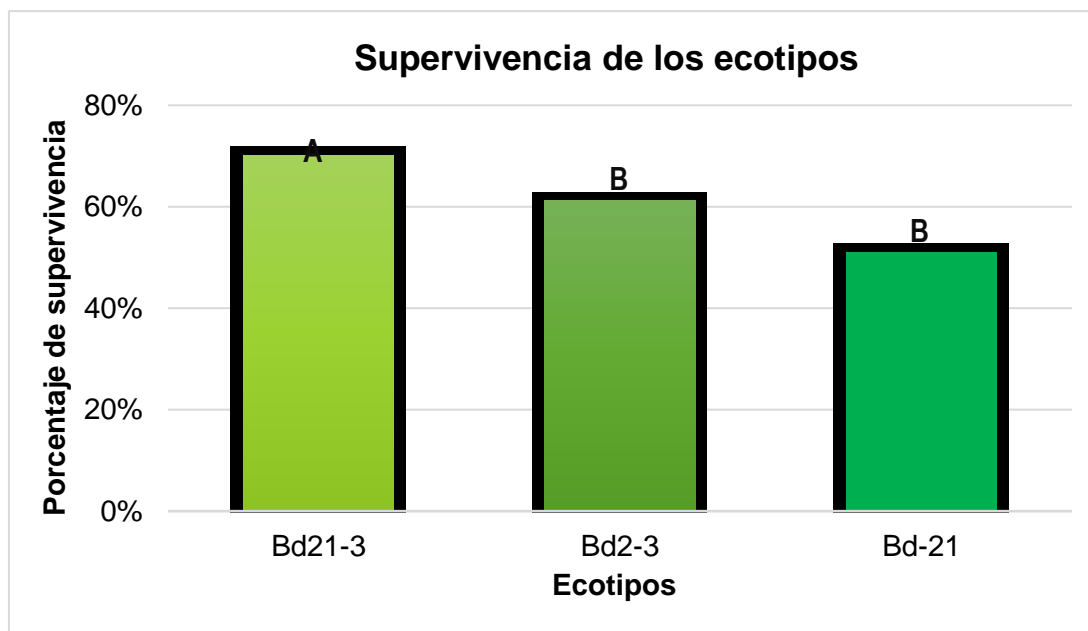


**Figura 15:** Proporción de daño en hojas de los ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21 de *Brachypodium distachyon*. Se presentan tres diferentes tiempos 1, 1.5 y 2 d de estrés por sumersión, (n=11-16), se realizó una prueba T-Student para las comparaciones en el mismo tiempo de estrés, de los tres diferentes ecotipos, letras iguales indican que estadísticamente no existe diferencia significativa, letras diferentes indican que estadísticamente son diferentes, las barras de error son la media  $\pm$  E.E.

Yeung *et al.* (2018) reportaron que los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* que presentan una mayor tolerancia desarrollan una mejor regulación de la producción y eliminación de ROS posterior al estrés por inundación, así como de antioxidantes que le confiere una óptima regulación homeostática celular. Se puede predecir que una menor incidencia en la proporción de daños varió entre ecotipos debido a que expresan diferentes transcritos que les confieren una mayor tolerancia ante el estrés por inundación y que durante el periodo de post-sumersión realizarían una eficiente regulación homeostática.

Adicionalmente a la implementación del índice de daño, se hizo el clásico agrupamiento simple de la supervivencia de las plantas de los nueve tiempos de estrés de los tres ecotipos en los tres ensayos realizados (Figura 16). El ecotipo

Bd21-3 fue estadísticamente diferente a los ecotipos Bd2-3 y Bd-21. Sin embargo, entre estos últimos no existió una diferencia significativa estadísticamente. Se obtuvo que entre los ecotipos Bd2-3 y Bd-21 no existieran diferencias significativas. Lo anterior indica que la clasificación de supervivencia, que involucra un factor "sí/no" puede enmascarar diferencias entre los ecotipos y también apunta a que el índice de daño es una herramienta más útil para representar la tolerancia al estrés en *Brachypodium distachyon*.

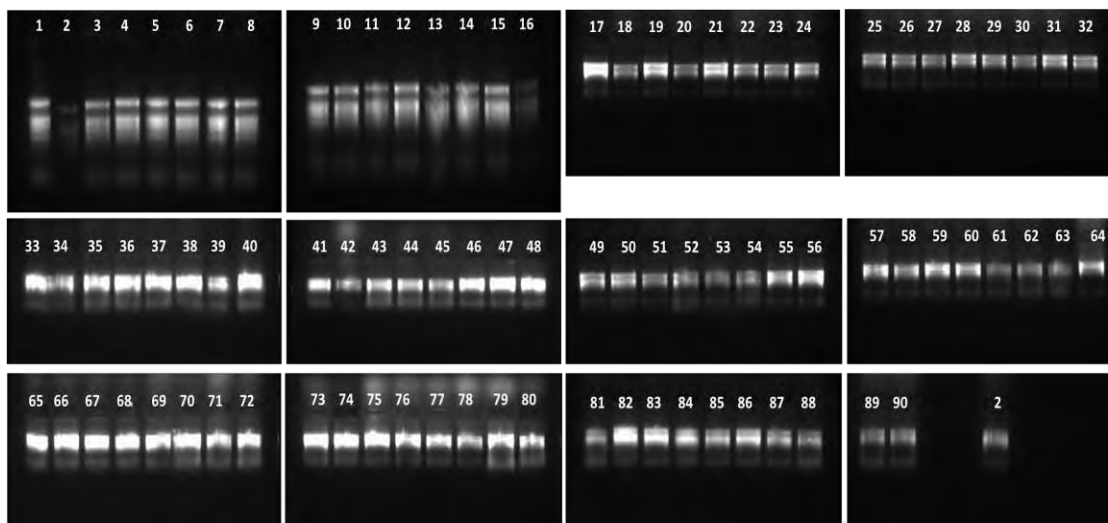


**Figura 16:** Porcentaje de supervivencia de los tres diferentes ecotipos de *Brachypodium distachyon*. Los datos se obtuvieron en el día seis de su periodo de recuperación, después de 6d de estrés por sumersión. En la gráfica se observa el promedio de tres experimentos independientes (n=5-10), se empleó la prueba estadística ANOVA y una prueba Tukey para la diferencia de medias. Letras iguales indican que estadísticamente no presentan diferencias significativas, las letras diferentes si presentan diferencias significativas estadísticamente.

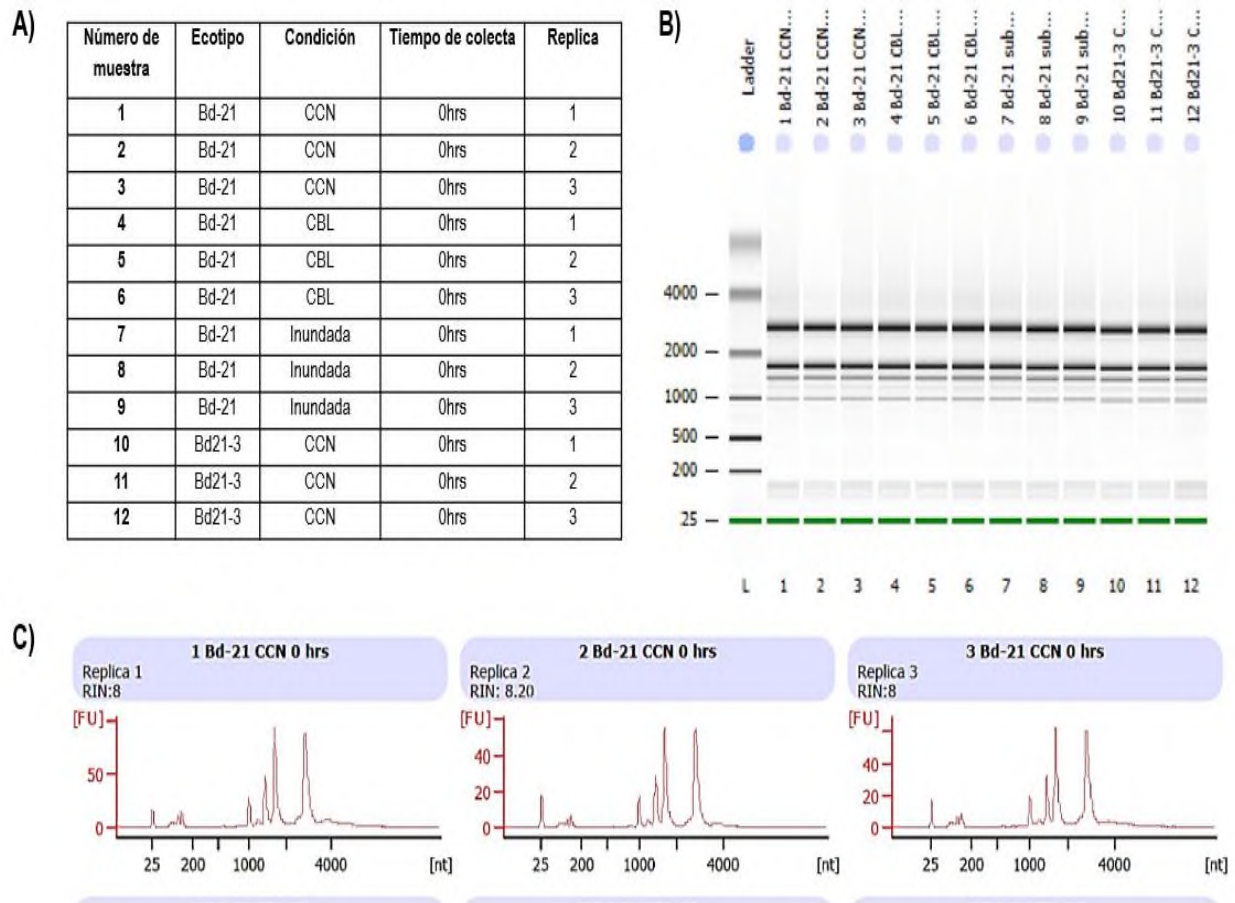
Tomando los datos en conjunto, se determinó que Bd21-3 es un ecotipo tolerante. Tanto el registro fotográfico, el índice de daño y el porcentaje de supervivencia apoyan esta conclusión. De manera cuantitativa, la adaptación del índice de daño en *Brachypodium distachyon* permitió catalogar a Bd21-3 y a Bd-21 como los ecotipos de mejor contraste para los subsecuentes experimentos moleculares.

## 7.4 Calidad de muestras secuenciadas por RNA-seq

Para estudiar los cambios transcriptómicos oscilatorios y circadianos, se realizó un experimento que permitió coleccionar muestras a lo largo de todo un día de sumersión. En total, 90 muestras se procesaron para extraer el RNA total de parte aérea. Todas las muestras extraídas presentaron un patrón característico con dos bandas dominantes del rRNA en geles de agarosa, así como bandas menores de rRNA de cloroplastos (Figura 17 y 18B y C). Cuando se calcularon los valores de integridad RIN que determina la calidad de las muestras de RNA extraído (Babu, S. y Gassmann, 2011), todas las muestras presentaron valores en un rango de 7.4 - 8.9 (Figura 18C; Anexo 3) lo que indica buena integridad, ya que su valor recomendado debe de ser mayor a 6.4.



**Figura 17:** Verificación de la integridad de RNA, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para \*2 se repitió la extracción.



**Figura 18:** Verificación de integridad y calidad de RNA de hoja de *Brachypodium distachyon*. Verificación de integridad y calidad de RNA de hoja de *Brachypodium distachyon* previo a la secuenciación. Se muestran algunas de las primeras 12 muestras para el control de calidad. **A)** Codificación de las muestras colectadas, **B)** Visualización de integridad en Bioanalyzer, **C)** Gráficas del cálculo de RIN, como ejemplo se presentan las tres primeras muestras que correspondientes al ecotipo Bd-21 CCN (Control Crecimiento Normal), donde se pueden observar los dos picos característicos para los rRNA 18s y 28s.

## 7.5 Análisis de RNA-seq

Las 90 bibliotecas pasaron satisfactoriamente los análisis de calidad electroforéticos y espectrofotométricos y se procedieron a secuenciar como servicio en el LANGEBIO.

En el **anexo 4**, se puede observar el número de lecturas obtenidas en millones de secuencias (formato 1x100) que se obtuvieron. En algunos casos fue

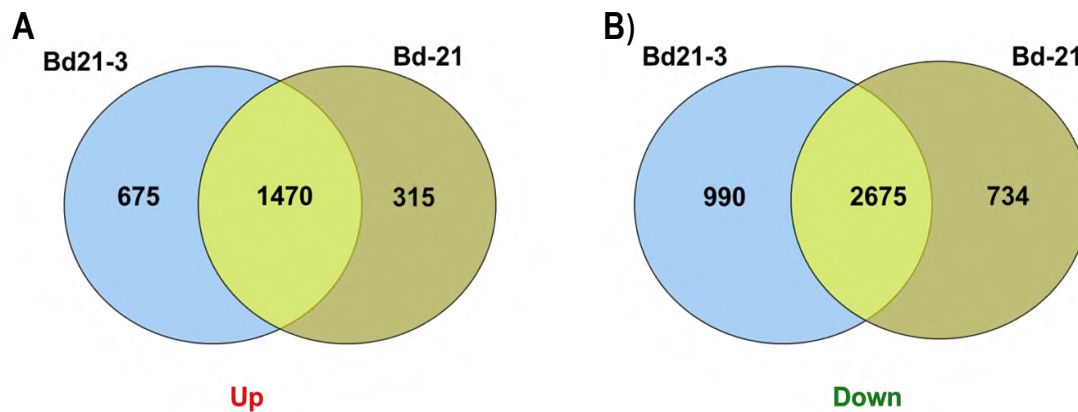
necesario resecuenciar las muestras hasta obtener  $\geq 15$  millones de lecturas en cada biblioteca. Estas secuencias digitales se sometieron a su análisis bioinformático y produjeron listas de genes con sus cuentas por millón y comparaciones pareadas  $\text{Log}_2 \text{FC}$  que se utilizaron para realizar agrupamiento y el análisis GO para que los datos obtenidos sean útiles en términos biológicos.

El análisis GO aprovecha un lenguaje estandarizado del uso de genes y sus productos génicos, su registro público universal, y asociación a un identificador (número GO) con las anotaciones que permite la categorización de grupos génicos de acuerdo a la función que realicen a nivel molecular (Gene Ontology Consortium 2004).

Los análisis de Ontología Genética (GO) se realizaron para cada uno de los cinco puntos de colecta a lo largo del día; ZT0h amanecer (A), ZT8h medio día (MD), ZT16h antes de anocheecer (AA), ZT20h media noche (MN) y ZT24h nuevo amanecer (NA).

## **7.6 Análisis transcriptómico de ZT0h (amanecer). Genes regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos**

En el análisis GO que corresponde al punto inicial ZT0h, se identificaron 1470 transcritos regulados positivamente en común (Figura 19A). Aquellos que tienen identidad corresponden a procesos de fosforilación (GO: 001610, 51 genes), regulación de procesos metabólicos (GO: 0019222, 92 genes) y la regulación de la expresión de genes (GO: 0010968, 63 genes) (Tabla 3).



**Figura 19:** Transcritos regulados en ZT0h. Diagrama de Venn de transcritos regulados exclusiva y comúnmente en los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd21-3 (círculo azul) y Bd-21 (círculo amarillo). **A)** Transcritos regulados positivamente (Up), **B)** Transcritos regulados negativamente (Down). FDR <  $0.05 \times 10^{-5}$ ;  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$  ó  $\leq -1.5$

De manera interesante para la hipótesis y los objetivos de esta tesis, en la categoría común de regulación positiva GO Fotoperiodismo (GO:0048573) significativa con un sólo gen, se encontró a Bradi2g05226 que codifica para GIGANTEA (*G1*). Igualmente, la categoría ritmo circadiano (GO:0042752) resultó significativa con el gen Bradi4g16630 que codifica para KELCH REPEAT F-BOX1 (*FKF1*).

*G1* es una proteína central del reloj circadiano y medía la comunicación cruzada del estado metabólico, el desarrollo y el estrés. El papel de *G1* en el estrés sólo se ha estudiado en la sequía donde se describió que su expresión aumentada incrementa la síntesis de ABA a través de factores de transcripción auxiliares (Baek *et al.*, 2020). Con esta información, se puede hipotetizar que, en la inundación, la presencia aumentada de *G1* en el amanecer puede ser un señalizador positivo de la quiescencia. Dados los múltiples puntos de control de *G1*, su descubrimiento como gen involucrado en la respuesta a la inundación, abrirá líneas de investigación prometedoras para el estudio holístico de este estrés.

En *Arabidopsis*, *FKF1* es un gen fotoperiódico y regulador negativo de la síntesis de celulosa (Yuan *et al.*, 2019). Se puede hacer la hipótesis de que, en la

inundación, al expresarse más en la noche, puede ser también un factor central en la respuesta quiescente de *Brachypodium*.

Además, se obtuvieron un total de 2675 transcritos regulados negativamente en común para ambos ecotipos. De acuerdo con su abundancia se relacionaron con grupos involucrados con el proceso de metabolismo de lignina (GO:0009808), transporte de iones metálicos (GO:0030001), desintoxicación oxidante celular (GO:0098869), respuesta a estímulos endógenos (GO:0098869).

En ambos ecotipos, dos genes de respuesta a estímulos endógenos codificaron para factores de respuesta al etileno, el gen Bradi2g50035 codifica para (*ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 2*) y el gen Bradi5g17480 que codifica para (*ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR*). Ambos genes confirman la respuesta previamente reportada de la hormona etileno como un factor importante de la inundación (Sasidharan *et al.*, 2018).

### **7.6.1 ZT0h (Amanecer). Transcritos exclusivos de Bd21-3**

En el ecotipo Bd21-3 se obtuvo una regulación positiva de 675 transcritos. Se identificaron los grupos relacionados con procesos de óxido reducción (GO:0055114, 43 genes), respuesta a estímulos (GO:0050896, 29 genes), proceso metabólico de sacarosa (GO:0005985, 3 genes) y con el proceso metabólico de trehalosa (GO:0005991, 3 genes). Estos últimos transcritos codifican para la enzima que degrada a la threalosa-6-fosfato, un metabolito indicador de abundancia energética y de esta forma, aportan a la quiescencia (Peña-Castro *et al.*, 2014). La revisión de su expresión indicó que no poseen una oscilación circadiana y están regulados a lo largo de todo el tiempo o en el amanecer.

Con respecto a las regulaciones negativas, en el ecotipo Bd21-3 se obtuvo un total de 990 transcritos (Figura 19B). Se identificó la presencia de grupos relacionados con la respuesta a químicos (GO:0042221, 15 genes), proceso metabólico de lípidos y biosíntesis de lípidos (GO:0006629, GO:0006629, 13 y 10 genes respectivamente).

Otro grupo de interés de los transcritos regulados negativamente fue el involucrado en el proceso catabólico de macromoléculas de pared celular (GO:0016998, 3 genes). En conjunto, estos bloques concuerdan con un organismo que está apagando sistemas de alto consumo energético y una modulación del estrés oxidativo, como se reportó previamente (Rivera-Contreras *et al.*, 2016).

### **7.6.2 ZT0h (Amanecer). Transcritos exclusivos de Bd-21**

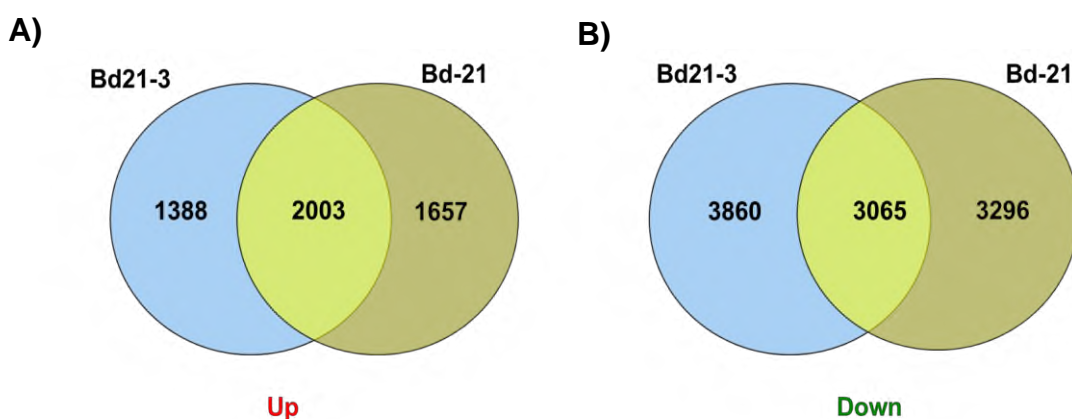
El ecotipo Bd-21 presentó 315 regulaciones positivas de las cuales se identificaron grupos involucrados en la regulación de diversos procesos metabólicos, se encontró el enriquecimiento de grupos GO para las categorías de regulación de expresión de genes (GO:0010468, 14 genes), proceso metabólico de RNA (GO:0016070, 16 genes), proceso metabólico de compuestos cíclicos orgánicos (GO:1901360, 22 genes), y modificación de histonas (2, genes).

Uno de los principales grupos que generó interés fue la familia de factores de transcripción *WRKY*. En la actualidad, se considera que son genes clave en la regulación de la reprogramación transcripcional de las plantas, debido a que modifican los patrones de expresión y activan las diferentes vías de señalización y redes de regulación de respuesta al estrés abiótico y biótico (Jiang *et al.*, 2017). Estas proteínas se expresan temporalmente en relación con la condición que experimenta la planta y son específicos del tipo de estrés y en ocasiones, específicos de las diferentes especies de plantas (Jiang *et al.*, 2017)

Con respecto a las regulaciones negativas, del ecotipo Bd-21 se obtuvo un total de 734 transcritos. Se identificaron grupos de interés como los involucrados en el proceso de óxido reducción (GO:0055114, 40 genes), proceso metabólico de lignina (GO:0009808, 5 genes), proceso metabólico de fenilpropanoide (GO:0009698, 5 genes). Así como también el proceso de fotosíntesis (GO:0015979, 5 genes) y de respuesta a hongos (GO:0009620, 1 gen). Todas estas categorías GO indican un proceso quiescente para enfrentar a la inundación por parte del ecotipo sensible.

## 7.7 Análisis transcriptómico de ZT8h (Medio día) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.

En la colecta de ZT8h, se obtuvo una regulación positiva de 2003 transcritos en común (Figura 20A). Se identificaron grupos involucrados en la regulación de proceso metabólicos de RNA (GO:0051252, 105 genes), regulación de expresión de genes (GO:0010468, 107 genes) y la regulación de procesos celulares (GO:0050794, 132 genes).



**Figura 20:** Transcritos regulados en ZT8h. Diagrama de Venn de transcritos regulados exclusiva y comúnmente en los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd21-3 (círculo azul) y Bd-21 (círculo amarillo). **A)** Transcritos regulados positivamente (Up), **B)** Transcritos regulados negativamente (Down). FDR < 0.05 x 10<sup>-5</sup>; Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5 ó ≤- 1.5

Para los 3065 transcritos regulados negativamente en común para ambos ecotipos (Figura 20B). Se identificaron los grupos involucrados con procesos de óxido reducción (GO:0055114, 175 genes), respuesta a químicos (GO:0042221, 65 genes), respuesta al estrés oxidativo (GO:0006979, 38 genes). También se identificó la regulación negativa de los grupos relacionados con el proceso de respuesta a auxinas (GO:0009733, 18 genes) y la biogénesis de pared (GO:0042546, 11 genes).

Se regularon 18 transcritos en común negativamente relacionados con el grupo de respuesta a auxina (GO:0009733; Figura 21), una fitohormona fundamental en el desarrollo de las plantas y en la respuesta al estrés. La literatura

disponible nos indica que la familia de genes de respuesta temprana a auxina *Small Auxin-Up RNA* (SAUR), desempeña funciones relacionadas con diversos procesos como el crecimiento, desarrollo y respuesta al estrés de las plantas (Zhang *et al.*, 2021). En *Oryza sativa* se identificaron genes *OsSAUR* inducidos por estrés abiótico, que corrobora que esta familia de genes media las respuestas de estrés (Wen *et al.*, 2020). Sin embargo, aún falta estudiar a detalle su función y la red de regulación de esta familia para poder realizar alguna hipótesis de su papel en el estrés por sumersión.

	Name	21s/21c	213c/21c	213s/21s	213s/213c
<i>OsSAUR30</i>	Bradi1g28120	-4.1265	-0.3209	-2.5282	-6.3339
<i>OsSAUR25</i>	Bradi1g32390	-3.2272	0.0637	-0.0655	-3.3564
<i>OsSAUR27</i>	Bradi1g34240	-1.5269	1.1166	-0.9841	-3.6276
<i>OsSAUR24</i>	Bradi1g51490	-4.4740	0.2191	-0.8516	-5.5447
<i>CPuORF40</i>	Bradi3g30660	-1.6832	-0.1078	-1.6328	-3.2081
<i>OsSAUR36</i>	Bradi3g42240	-3.5900	0.3409	0.3670	-3.5639
<i>OsSAUR36</i>	Bradi3g42251	-6.0817	0.2830	1.5516	-4.8132
<i>OsSAUR57</i>	Bradi4g02140	-5.5863	0.7614	1.8526	-4.4951
<i>OsSAUR37</i>	Bradi4g31080	-4.5840	1.1044	-0.2492	-5.9376
<i>OsSAUR51</i>	Bradi4g36950	-2.9564	-0.1793	0.2081	-2.5690
<i>OsSAUR51</i>	Bradi4g36954	-3.4385	-0.0680	-0.2515	-3.6220
<i>OsSAUR51</i>	Bradi4g36956	-2.9622	0.1403	0.8185	-2.2840
<i>OsSAUR45</i>	Bradi4g36972	-3.8394	0.2448	1.8738	-2.2104
<i>OsSAUR53</i>	Bradi4g36974	-4.0598	-0.2953	1.5456	-2.2189
<i>OsSAUR53</i>	Bradi4g36978	-2.4257	-0.7990	-0.4660	-2.0927
<i>AUXIN RESPONSIVE PROTEIN</i>	Bradi4g37025	-2.2187	1.1349	0.5059	-2.8477
<i>OsSAUR55</i>	Bradi4g37026	-1.6046	1.2675	-1.5011	-4.3732
<i>OsSAUR20</i>	Bradi5g21060	-2.5056	-0.0978	-0.7720	-3.1798

**Figura 21:** Transcritos de la familia SAUR (GO:0009733) de regulación de auxina regulados negativamente en ambos ecotipos en sumersión (ZT8).

### 7.7.1 ZT8h (Medio día). Transcritos exclusivos de Bd21-3

En el ecotipo Bd21-3 se obtuvieron 1388 transcritos exclusivos regulados positivamente de las que se identificaron grupos de interés relacionados con el proceso de fosforilación (GO:0016310, 60 genes). Otro grupo de interés fue el relacionado con el proceso metabólico de ADP (GO:0046939, 14 genes) y el grupo relacionado con el proceso metabólico de oxoácidos (GO:0043436, 41 genes). Este perfil GO indicaría la relevancia de la disponibilidad de luz en la reconstrucción temporal de un catabolismo de supervivencia.

Los transcritos negativos exclusivos del ecotipo Bd21-3 fueron 3860, se identificaron grupos relacionados en el proceso de óxido reducción (GO:0055114, 186 genes) y respuesta a químicos (GO:0042221, 66 genes). Otro grupo de interés identificado fue el relacionado con el proceso metabólico de carbohidratos (GO:0005975,66 genes). Ambos grupos indican que, al entrar la acción de la luz, el transcriptoma se reconfiguraría hacia el control de los flujos energéticos cruciales de carbono y fosforo, principalmente por medio de los carbohidratos.

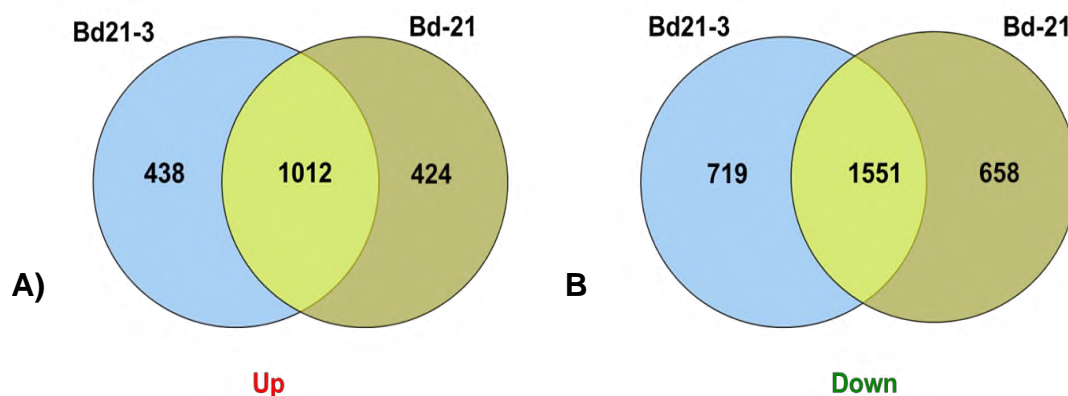
### **7.7.2 ZT8h (Medio día). Transcritos exclusivos de Bd-21**

El ecotipo Bd-21 presentó 1657 transcritos positivos que se agruparon en el proceso de fosforilación (GO:0016310, 70 genes), proceso glucolítico (GO:0006096,12 genes), regulación del proceso metabólico primario (GO:0080090, 131 genes).

Negativamente se obtuvieron 3296 transcritos exclusivas y se identificaron grupos relacionados con el proceso relacionado con respuesta a sustancias tóxicas (GO:0009636, 31 genes), biogénesis de pared celular (GO:0042546, 8 genes), proceso metabólico de lignina (GO:0009808, 7 genes), respuesta a auxinas (GO:0009733, 7 genes), y proceso metabólico de reserva de energía (GO:0006112, 3 genes).

## **7.8 Análisis transcriptómico de ZT16h Antes de Anochecer (AA) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.**

El análisis GO de ZT16h Antes de Anochecer (AA) del estrés generado por sumersión indicó que hay un total de 1012 transcritos positivos y 1551 transcritos negativos en común (Figura 22).



**Figura 22:** Transcritos regulados en ZT16h. Diagrama de Venn de transcritos regulados exclusiva y comúnmente en los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd21-3 (círculo azul) y Bd-21 (círculo amarillo). **A)** Transcritos regulados positivamente (Up), **B)** Transcritos regulados negativamente (Down). FDR <  $0.05 \times 10^{-5}$ ;  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$  ó  $\leq -1.5$ .

De las 1012 transcritos positivos en común, se identificaron grupos involucrados en la regulación de proceso de óxido reducción (GO:0055114, 87, genes), regulación de procesos celulares (GO:0050794, 78 genes), regulación de expresión de genes (GO:0010468, 61), biosíntesis de RNA (GO:0032774, 61 genes), respuesta a estímulos (GO:0050896, 46), respuesta al estrés (GO:0006950, 26 genes), proceso metabólico y biosíntesis de vitamina B6 (GO:0042816, GO:0042819). Otro de los grupos identificados fueron los relacionados con el proceso metabólico de triptófano y su biosíntesis (GO:0006568, GO:0000162) y el proceso metabólico de arginina (GO:0006525).

En los 1551 transcritos regulados negativamente se identificaron grupos relacionados con el proceso de óxido reducción ([GO:0055114, 111 genes), procesos de respuesta a químicos (GO:0042221, 35 genes), desintoxicación ([GO:0098754, 29 genes), proceso metabólico de lignina (GO:0009808, 10 genes) y la biosíntesis de lípidos (GO:0008610, 14 genes). Otro grupo de interés identificado fue el involucrado en los procesos de replicación de ADN (GO:0006260, 10 genes) y biosíntesis de ADN (GO:0071897, 8 genes).

### 7.8.1 ZT16h Antes de Anochecer (AA). Transcritos exclusivos de Bd21-3

Con respecto a los transcritos exclusivos del ecotipo Bd21-3 se obtuvieron 438 regulaciones positivas y 719 transcritos negativos (Figura 22). En los transcritos positivos del ecotipo Bd21-3 se identificaron las categorías GO correspondientes a procesos de óxido reducción (GO: 0055114), con 119 transcritos regulados positivamente, en este grupo se regularon enzimas como; *PEROXIDASE* (Bradi1g17870, Bradi1g27910, Bradi2g10150, Bradi5g27220), *CYTOCHROME P450* (Bradi1g24340, Bradi2g07597, Bradi3g06300, Bradi3g06340, Bradi3g19220, Bradi3g19240, Bradi3g27500, Bradi4g38290), *ALCOHOL OXIDASE* (Bradi3g28677), el miembro menos abundante de la familia de las *NITRATE REDUCTASE* (Bradi3g57680), y enzimas reguladoras de ROS propias de un estrés por sumersión.

Esto nos indicaría que en el ecotipo Bd21-3 realizaría una mejor regulación para asegurar una correcta eliminación de ROS y con ello tener la capacidad evitar daños graves que pongan en riesgo la supervivencia de la planta. En el presente estudio encontramos que en las colectas de ZT0h y ZT8h de estrés por sumersión, los ecotipos presentaron una regulación negativa para el proceso y óxido reducción esto podría sugerir que la regulación es mediada por la fase diurna que experimenta la planta, a su vez se podría relacionar con el nivel de azúcares y de procesos esenciales como la fotosíntesis, donde posiblemente las plantas aún conserven condiciones que les permitan realizar un buen manejo homeostático. De esta manera se podría considerar como un estrés temprano o inicial del que dependería la supervivencia de la planta en días posteriores.

Se identificaron 719 regulaciones negativas, relacionadas con el proceso metabólico y biosíntesis de compuestos organonitrogenados (GO:1901564, 40 genes, GO:1901566, 33 genes), proceso metabólico de ATP (GO:0046034, 6 genes), proceso metabólico y biosíntesis de ácidos grasos (GO:0006631, GO:0006633, 6 genes). La supresión de procesos biosintéticos de ácidos grasos

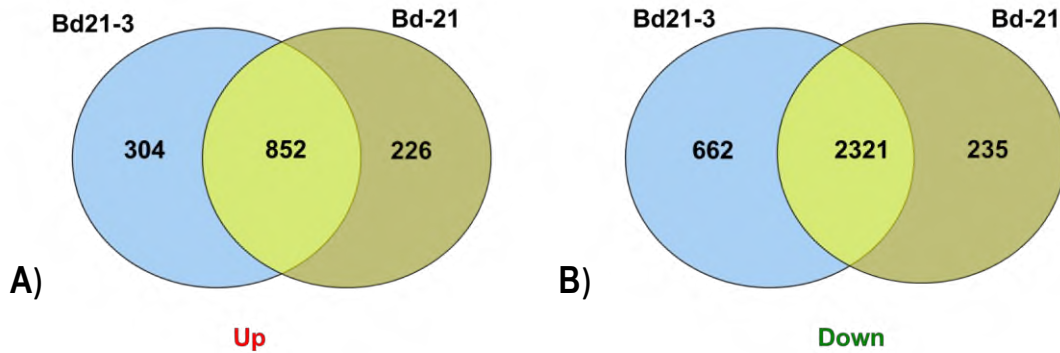
puede ser un procedimiento para ahorrar energía, no obstante, el costo en el mantenimiento de la integridad de membranas puede ser el costo de su activación.

### **7.8.2 ZT16h Antes de Anochecer (AA). Transcritos exclusivos en Bd-21**

Para el ecotipo Bd-21 se obtuvieron un total de 424 regulaciones positivas y 658 regulaciones negativas (Figura 22B). Se identificaron grupos comunes GO con diferentes miembros de la misma categoría regulados de forma diferente, por ejemplo, la ruta de fenilpropanoides (GO:009698). Otros grupos son proceso metabólico y biosintético de RNA (GO:0051252, 23 genes, GO:0032774, 24 genes), regulación de expresión genética (GO: 0010468, 23 genes). Otro grupo identificado fue el involucrado en el transporte del ion potasio (GO:0006813, GO:0071805, 3 genes), proceso metabólico y biosíntesis de vitaminas (GO:0006766, GO:0009110, 2 genes).

### **7.9 Análisis transcriptómico de ZT20h Media Noche (MN) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.**

En el análisis GO correspondiente a ZT20h Media noche (MN) del estrés generado por sumersión se obtuvieron un total de 852 transcritos positivos para ambos ecotipos, 304 transcritos exclusivos del ecotipo Bd21-3 y 226 transcritos exclusivos del ecotipo Bd-21 (Figura 23A). Los transcritos negativos se obtuvieron 2321 en común, 662 transcritos exclusivos de Bd21-3 y 235 transcritos exclusivos de Bd-21 (Figura 23B).



**Figura 23:** Transcritos regulados de ZT20h. Diagrama de Venn de transcritos regulados exclusiva y comúnmente en los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd21-3 (círculo azul) y Bd-21 (círculo amarillo). **A)** Transcritos regulados positivamente (Up), **B)** Transcritos regulados negativamente (Down). FDR <  $0.05 \times 10^{-5}$ ;  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$  ó  $\leq -1.5$ .

Los 852 transcritos regulados positivamente en común se identificaron grupos relacionados con el proceso glucolítico (GO:0006096, 13 genes), proceso de fosforilación (GO:0016310, 15 genes) y proteínas de fosforilación (GO:0006468, 35 genes).

Uno de los grupos de interés, que mostró el análisis GO se relacionó con el proceso de generación de ATP a través del ADP (GO:0006757) que se expresó de manera positiva en común con un total de 13 transcritos. Se realizó una búsqueda para identificar a los genes implicados identificando 5 grupos de enzimas relacionadas con el proceso de glucólisis como son enolasas, fosfofructocinasas, aldolasas, fosfoglicerato cinasas y piruvato cinasas. En un reporte de ecotipos de *Arabidopsis* con tolerancia diferencial a la sumersión, van Veen *et al.* (2016) encontraron a una enzima de esta misma ruta metabólica, la piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK), como el principal factor diferencial entre ecotipos sensibles y tolerantes. De tal manera, esta familia de enzimas del metabolismo de glucosa se vuelve un blanco interesante para futuros estudios en *Brachypodium*.

Se obtuvieron 2321 transcritos negativos en común, se identificaron grupos relacionados con el proceso de respuesta a sustancias toxicas (GO:0009636, 38 genes), desintoxicación (GO:0098754, 38 genes), respuesta al estrés oxidativo

(GO:0006979, 33 genes). Otro grupo identificado se reaccionó con el proceso metabólico de lignina (GO: 0007017, 25 genes), proceso catabólico de fenilpropanoide (GO:0009698, 12 genes). Así como también el grupo relacionado con el proceso de movimiento de microtúbulos (GO\_0007017, 32 genes). Todos ellos indicadores de un proceso molecular de quiescencia que va desde el sacrificio de transportadores y de la expansión celular.

### **7.9.1 ZT20h Media Noche (MN). Transcritos exclusivos de Bd21-3**

En las regulaciones positivas exclusivas del ecotipo Bd21-3 se obtuvo un total de 304 transcritos, y se identificaron grupos relacionados con el proceso metabólico de la fosforilación (GO:0016310, 15 genes), proceso biosintético de vitaminas (GO:0009110, 2 genes) y el proceso biosintético de riboflavina (GO:0006771, 2 genes).

El ecotipo Bd21-3 presentó 662 transcritos negativos, y se identificaron grupos relacionados con proceso de fotosíntesis (GO:0015979, 7 genes), proceso biosintético de lípidos (GO:0008610, 9 genes) y proceso biosintético de terpenoides (GO:0016114, 2 genes).

### **7.9.2 ZT20h Media Noche (MN). Transcritos exclusivos de Bd-21**

El ecotipo Bd-21 presentó 226 transcritos positivos, se identificaron grupos relacionados con proceso biosintético de RNA (GO:0032774, 14 genes), transporte de iones de zinc (GO:0006829, 1 gen), proceso metabólico de reserva de energía (GO:0006112, 13 genes) y la biogénesis ribosomal (GO:0042254, 2 genes).

Se identificaron 235 transcritos negativos, relacionados con procesos metabólico de lípidos (GO:00066297 9 genes), proceso biosintético de ácidos grasos (GO:0006633, 5 genes), proceso metabólico de trehalosa (GO:0005991, 2 genes) y el proceso metabólico de ácido carboxílico (GO: 0043436, 6 genes).

Otro grupo de enzimas glucolíticas encontrado en diversas categorías fue el conformado por las piruvato cinasas que son parte del manejo de fosforilación. En este estudio se encontraron tres transcritos Bradi2g10530, Bradi4g42810, Bradi5g2614, y adicionalmente fue de interés el gen Bradi5g26140, debido a que presentó una expresión positiva para ambos ecotipos. En comparación con el trabajo realizado por Rivera-Contreras *et al.*, 2016 donde este gen permaneció con una transcripción nula para los ecotipos de Bd21 y Bd2-3, lo que sugiere que posiblemente este gen se exprese al anochecer (Figura 24).

	Name	21s/21c	213c/21c	213s/21s	213s/213c
ENOLASE	Bradi1g51540	4.5209	-0.0783	-0.9543	3.6449
ENOLASE	Bradi1g68080	2.0275	0.1823	0.6745	2.5197
FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE ISOZYME	Bradi2g01350	2.0598	0.1580	-0.2943	1.6076
6-PHOSPHOFRUCTOKINASE	Bradi2g05720	1.6122	-0.2397	1.0013	2.8532
PYRUVATE KINASE	Bradi2g10530	1.4039	-0.0432	0.9464	2.3935
6-PHOSPHOFRUCTOKINASE	Bradi2g19326	4.1627	-0.1086	0.9810	5.2523
FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE ISOZYME	Bradi2g58050	1.7977	0.0761	0.8568	2.5784
PHOSPHOGLYCERATE KINASE PROTEIN	Bradi3g05220	2.5832	0.0514	0.8175	3.3493
PYROPHOSPHATE-FRUCTOSE 6-PHOSPHATE 1-PHOSPHOTRANSFERASE SUBUNIT ALPHA	Bradi3g22340	3.7909	0.2007	0.3831	3.9733
ENOLASE	Bradi3g22550	1.4543	-0.0096	0.7816	2.2455
ENOLASE	Bradi4g29250	1.9619	-0.2078	0.3144	2.4841
PYRUVATE KINASE	Bradi4g42810	2.1166	0.0913	1.0116	3.0369
PYRUVATE KINASE	Bradi5g26140	1.0202	-0.0158	1.2750	2.3111

**Figura 24:** Transcritos expresados en la colecta de ZT20h. En la categoría (GO:0006757), correspondiente a la generación de ATP a través del ADP. Se expresaron 13 genes con una regulación positiva en común, para ambos ecotipos.

Otro grupo de interés es el relacionado con las fosfofructoquinasas, existen dos grupos de fosfofructoquinasas vegetales, el grupo mejor caracterizado es el de la enzima fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato inorgánico (PFP). En este estudio se encontró el gen que codifica la enzima *PYROPHOSPHATE FRUCTOSE 6-PHOSPHATE 1-PHOSPHOTRANSFERASE SUBUNIT ALPHA* (Bradi3g22340), presentó una expresión positiva para ambos ecotipos en condiciones de sumersión y en condición control se encuentra apagado, en comparación con el trabajo realizado por Rivera-Contreras *et al.*, 2016 donde este mismo gen se encuentra apagado en condiciones de estrés por sumersión y control.

Se sabe que esta enzima se expresa en gran parte de los tejidos vegetales, es la encargada de convertir de manera reversible la fructosa-6-fosfato, en fructosa-

1,6-bifosfato, utilizando como sustrato el (PPi) pirofosfato inorgánico (Branco-Price *et al.*, 2008). Recientemente Chen *et al.*, 2020 estudiaron la función de PFP1 en el llenado del grano de arroz y descubrieron que se ajusta al nivel de flujo metabólico. A pesar de que esta enzima está conformada por dos subunidades únicamente la subunidad  $\alpha$  alfa es la parte reguladora de esta enzima. Sin embargo, aún se desconoce completamente todas las acciones donde esta enzima se involucra de manera directa e indirectamente.

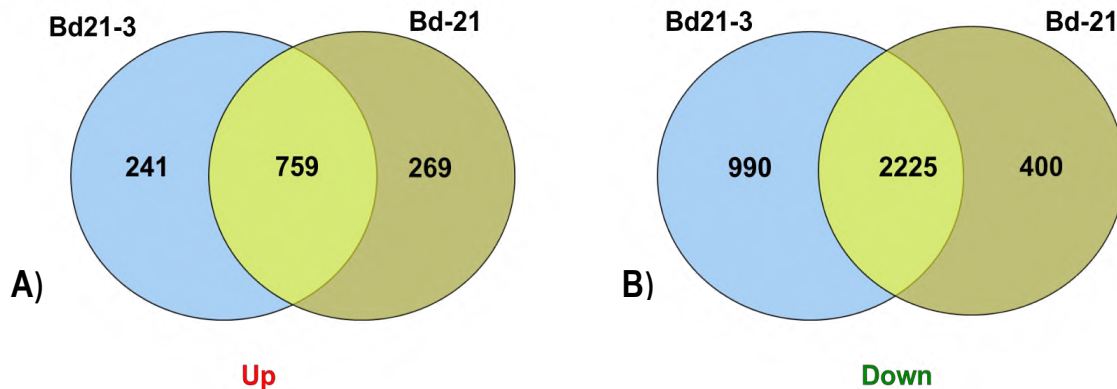
Mediante estudios anteriores se sabe que enzimas como enolasas, piruvato quinasa y fosfofructoquinasa son claves de la regulación de la glucólisis vegetal (Branco-Price *et al.*, 2008), por lo tanto, se ha considerado que una buena regulación de estas enzimas le confiere a la planta una mayor tolerancia ante cualquier tipo de estrés abiótico. En el ZT16 (atardecer) también se encontraron estos transcritos, lo que sugiere que, al presentarse una regulación positiva en el final de la noche, la planta se encuentra mejor preparada para entrar a esta fase de mayor ausencia de energía. Estos transcritos aquí discutidos son una sección muy interesante del transcriptoma que merece una caracterización más profunda.

El gen que presentó una mayor transcripción positiva en condiciones de sumersión en ambos ecotipos codifica para la enzima 6-*PHOSPHOFRUCTOKINASE* (Bradi2g19326). Mustroph *et al.* (2010) lograron encontrar siete genes homólogos en *Arabidopsis thaliana* encontrando que el gen PFK2 (At4g26270) homólogo de Bradi2g19326 en *Brachypodium distachyon* codifica específicamente para una fosfofructoquinasa dependiente de ATP y que esta enzima presenta una mayor actividad gracias a sus sitios específicos ricos en Gly y Lys.

### **7.10 Análisis transcriptómico ZT24h Nuevo Amanecer (NA) regulados positiva y negativamente en común para ambos ecotipos.**

En el análisis GO de ZT24h Nuevo Amanecer (NA) del estrés generado por sumersión se obtuvieron un total de 759 transcritos positivos en común, 241 transcritos exclusivos del ecotipo Bd21-3 y 269 transcritos exclusivos del ecotipo

Bd-21 (Figura 25A). Con respecto a las transcritos negativos se obtuvieron 2025 en común, 990 transcritos exclusivos de Bd21-3 y 400 transcritos exclusivos de Bd-21 (Figura 25B).



**Figura 25:** Transcritos regulados de ZT24h. Diagrama de Venn de transcritos regulados exclusiva y comúnmente en los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd21-3 (círculo azul) y Bd-21 (círculo amarillo). **A)** Transcritos regulados positivamente (Up), **B)** Transcritos regulados negativamente (Down). FDR <  $0.05 \times 10^{-5}$ ;  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$  ó  $\leq -1.5$ .

En los 759 transcritos regulados en común positivamente, se identificaron grupos relacionados con el proceso de óxido reducción (GO:0055114, 61 genes), fosforilación (GO:0016310, 12 genes), respuesta a estímulos (GO:0050896, 36 genes), proceso metabólico de ácidos carboxílicos (GO:0019752, 10 genes) y regulación de la actividad de hidrolasa (GO:0051336, 8 genes).

Los grupos regulados positivamente en el ecotipo Bd21-3 corresponden a las categorías GO del proceso de fosforilación (GO:0016310), proceso metabólico de fósforo (GO:0006793) y compuestos que contienen fosfato (GO:0006796). Se regularon 17 transcritos de enzimas relacionadas con la defensa a patógenos como las proteínas receptoras *WAK* que son quinasas asociadas a la pared. Su función principal es en la resistencia a enfermedades bacterianas y fúngicas reforzando la pared celular, aumentando la biosíntesis de celulosa y fitoalexinas, al mismo tiempo son receptoras de pectina lo que las convierte en proteínas necesarias para brindar una respuesta al estrés biótico pues fungen como transductores de señales entre la

matriz extracelular y el citoplasma de la célula vegetal (Dou *et al.*, 2021). Sin embargo, aún se desconoce la función específica de esta familia de proteínas en *Brachypodium distachyon*.

Se puede proponer que la inundación crea un ambiente propicio para el crecimiento microbiano y pueden ser parte de la respuesta inmune innata. Esto proporciona un nuevo tema para futuras investigaciones.

Entre los 2225 transcritos regulados negativamente se identificaron grupos relacionados con el proceso de óxido reducción (GO:0055114, 139 genes), desintoxicación celular (GO:1990748, 33 genes), repuesta al estrés oxidativo (GO:0006979, 29 genes), respuesta a químicos (GO:0042221, 39 genes), proceso metabólico de carbohidratos (GO:0005975, 50 genes) y el proceso de reproducción (GO:0022414, 2 genes). Estos últimos son de la familia de las shugosinas, unos importantes puntos de control de la separación cromosomal (Hellmut *et al.*, 2020); de encontrarseles un papel activo en la tolerancia a la inundación, sería la primera vez en que el control cromosómico se involucra en este estrés.

#### **7.10.1 ZT24h Nuevo Amanecer (NA). Transcritos exclusivos de Bd21-3**

El ecotipo Bd21-3 presentó 241 transcritos positivos, se identificaron grupos relacionados con el proceso de fosforilación (GO:0016310, 12 genes), proceso metabólico de ácido carboxílico (GO:0019752, 10 genes), generación de ATP a partir de ADP (GO:0006757, 4 genes).

Se obtuvieron 548 transcritos negativos, se identificaron grupos de respuesta al estrés oxidativo (GO:0006979, 9 genes), respuesta a sustancias tóxicas (GO:0009636, 10 genes), desintoxicación (GO:0098754, 10 genes), proceso metabólico de lípidos (GO:0006629, 11 genes), proceso metabólico de óxido reducción (GO:0055114, 47 genes).

### **7.10.2 ZT24h Nuevo Amanecer (NA). Transcritos exclusivos de Bd-21**

El ecotipo Bd-21 presentó 269 transcritos positivos, y se identificaron procesos relacionados con el metabolismo (GO:0008152, 39 genes), proceso de óxido reducción (GO:0055114, 29 genes), transporte de iones (GO:0006811, 11 genes), transporte transmembranal (GO:0055085, 11 genes), proceso metabólico del ciclo de nitrato (GO:0042126, 1 gen) y proceso metabólico de cobalamina (GO:0009235, 1 gen).

Se obtuvieron 400 transcritos negativos, y se identificaron grupos involucrados en el proceso metabólico de carbohidratos (GO:0005975, 13 genes), proceso metabólico de lípidos (GO:0006629, 10 genes), proceso metabólico de ADN (GO:0006259, 9 genes), proceso metabólico de polisacáridos (GO:0005976, 4 genes), proceso metabólico de ácidos grasos (GO:0006631, 4 genes), proceso metabólico de glucógeno (GO:0005977, 2 genes), proceso metabólico de reserva de energía (GO:0006112, 2 genes), proceso metabólico de trehalosa (GO:0005991, 2 genes). En conjunto, estos grupos GO indican una planta que está agotando recursos energéticos inhibiendo rutas catabólicas e intentando activar procesos de uso de carbohidratos.

**Tabla 3:** Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT0h. Se presenta la categoría GO, el número de los genes involucrados y la significancia de los grupos, para ambos ecotipos de *Brachypodium distachyon* como los exclusivos de Bd21-3 y Bd-21.

GO Term	Genes	Bd-21 Up	Bd-21 Dwn	Up	Down	Bd21-3 Up	Bd21-3 Dwn
Phosphorylation [GO:0016310]	51			2.84E-03			
Regulation of metabolic process [GO:0019222]	92			1.60E-02			
Regulation of gene expression [GO:0010468]	14/83	2.41E-02		1.86E-03			
Lignin metabolic process [GO:0009808]	5		5.67E-05				
Photosynthesis [GO:0015979]	5		1.36E-02				
Phenylpropanoid metabolic process [GO:0009698]	5		7.13E-05				
Lignin metabolic process [GO:0009808]	5				4.77E-02		
Metal ion transport [GO:0030001]	25				9.04E-03		
Cellular oxidant detoxification [GO:0098869]	30				2.06E-03		
Response to endogenous stimulus [GO:0009719]	23				2.43E-09		
RNA metabolic process [GO:0016070]	16	4.73E-02					
Organic cyclic compound metabolic process [GO:1901360]	22	2.49E-02					
Histone modification [GO:0016570]	2	4.39E-02					
Obsolete oxidation-reduction process [GO:0055114]	43					6.04E-03	
Response to stimulus [GO:0050896]	29					1.07E-02	
Sucrose metabolic process [GO:0005985]	3					4.31E-04	
Trehalose metabolic process [GO:0005991]	3					1.12E-02	
Lipid biosynthetic process [GO:0008610]	10						1.48E-02
Cell wall macromolecule catabolic process [GO:0016998]	3						1.02E-02
pyruvate family amino acid metabolic process [GO:1902221]	4						9.50E-04

**Tabla 4:** Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT8h. Se presenta la categoría GO, el número de los genes involucrados y la significancia de los grupos, para ambos ecotipos de *Brachypodium distachyon* como los exclusivos de Bd21-3 y Bd-21.

GO Term	Genes	Bd-21 Up	Bd-21 Dwn	Up	Down	Bd21-3 Up	Bd21-3 Dwn
Erythrose 4-phosphate/phosphoenolpyruvate family amino acid metabolic process [GO:1902221]	8	1.85E-05					
Regulation of primary metabolic process [GO:0080090]	131	8.18E-05					
Glycolytic process [GO:0006096]	12/14	1.76E-04				4.16E-05	
Aromatic amino acid family catabolic process [GO:0009074]	5	6.14E-04					
Response to toxic substance [GO:0009636]	31		3.42E-06				
Cell wall biogenesis [GO:0042546]	8		3.23E-04				
Lignin metabolic process [GO:0009808]	7		4.75E-04				
Energy reserve metabolic process [GO:0006112]	3		2.68E-02				
Regulation of RNA metabolic process [GO:0051252]	105			2.39E-04			
Regulation of gene expression [GO:0010468]	107			9.91E-04			
Response to oxidative stress [GO:0006979]	38				2.08E-03		
Response to auxin [GO:0009733]	18				2.17E-02		
Response to chemical [GO:0042221]	65				2.09E-06		
Obsolete oxidation-reduction process [GO:0055114]	175				1.27E-04		
Obsolete oxidoreduction coenzyme metabolic process [GO:0006733]	16					3.20E-04	
Oxoacid metabolic process [GO:0043436]	41					8.59E-03	
Phosphorylation [GO:0016310]	60					1.05E-04	
Cellular oxidant detoxification [GO:0098869]	45						2.28E-04
Response to oxidative stress [GO:0006979]	40						3.40E-03
Carbohydrate metabolic process [GO:0005975]	66						3.66E-02

**Tabla 5:** Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT16h. Se presenta la categoría GO, el número de los genes involucrados y la significancia de los grupos, para ambos ecotipos de *Brachypodium distachyon* como los exclusivos de Bd21-3 y Bd-21

GO Term	Genes	Bd-21 Up	Bd-21 Dwn	Up	Down	Bd21-3 Up	Bd21-3 Dwn
Response to drug [GO:0042493]	13	9.48E-06					
Tryptophan metabolic process [GO:0006568]	5	1.03E-04					
Regulation of nucleic acid-templated transcription [GO:1903506]	83/117	5.29E-04		4.42E-03			
Glycolytic process [GO:0006096]	9	7.27E-04					
Alpha-amino acid metabolic process [GO:1901605]	16/9	1.29E-04				3.35E-04	
L-phenylalanine metabolic process [GO:0006558]	9					1.30E-04	
Carboxylic acid metabolic process [GO:0019752]	43					2.25E-02	
Obsolete oxidation-reduction process [GO:0055114]	147			1.05E-02			
Response to chemical [GO:0042221]	48			4.13E-02			
Regulation of gene expression [GO:0010468]	120			1.49E-02			
Detoxification [GO:0098754]	47/38		1.25E-03		1.23E-04		
Phenylpropanoid metabolic process [GO:0009698]	14/11/11		2.05E-03		2.72E-05		4.77E-03
Microtubule-based movement [GO:0007018]	21/34				5.14E-04		6.24E-18
Response to oxidative stress [GO:0006979]	42				1.68E-03		
Obsolete oxidation-reduction process [GO:0055114]	190				3.85E-03		
Microtubule-based process [GO:0007017]	34		1.51E-10				
Microtubule cytoskeleton organization [GO:0000226]	11						2.08E-02
Carbohydrate metabolic process [GO:0005975]	61						2.57E-02

**Tabla 6:** Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT20h. Se presenta la categoría GO, el número de los genes involucrados y la significancia de los grupos, para ambos ecotipos de *Brachypodium distachyon* como los exclusivos de Bd21-3 y Bd-21.

GO Term	Genes	Bd-21 Up	Bd-21 Dwn	Up	Down	Bd21-3 Up	Bd21-3 Dwn
Regulation of RNA biosynthetic process [GO:2001141]	13	7.39E-02					
Obsolete oxidation-reduction process [GO:0055114]	23	4.92E-04					
Energy reserve metabolic process [GO:0006112]	13	8.78E-02					
Ribosome biogenesis [GO:0042254]	2	4.04E-02					
Zinc ion transport [GO:0006829]	1	7.94E-02					
Phosphorylation [GO:0016310]	15/50			6.32E-07		1.38E-03	
Riboflavin biosynthetic process [GO:0009231]	2					7.83E-03	
Vitamin metabolic process [GO:0006766]	1					4.10E-02	
Lipid glycosylation [GO:0030259]	1					3.68E-02	
Glycolytic process [GO:0006096]	13			2.53E-06			
Fatty acid biosynthetic process [GO:0006633]	5		7.56E-05				
Lipid biosynthetic process [GO:0008610]	7		1.25E-04				
Oxoacid metabolic process [GO:0043436]	6		4.74E-02				
Trehalose biosynthetic process [GO:0005992]	2		9.41E-03				
Photosynthesis [GO:0015979]	7						4.28E-03
Microtubule-based movement [GO:0007018]	5						2.12E-02
Terpenoid metabolic process [GO:0006721]	2						2.56E-02
Lipid biosynthetic process [GO:0008610]	9						2.27E-02
Response to oxidative stress [GO:0006979]	33				4.22E-02		
Lignin catabolic process [GO:0046274]	12				1.26E-04		
Microtubule-based movement [GO:0007018]	25				3.24E-09		

**Tabla 7:** Análisis de ontología genética (GO) correspondiente a ZT24h. Se presenta la categoría GO, el número de los genes involucrados y la significancia de los grupos, para ambos ecotipos de *Brachypodium distachyon* como los exclusivos de Bd21-3 y Bd-21

GO Term	Genes	Bd-21 Up	Bd-21 Dwn	Up	Down	Bd21-3 Up	Bd21-3 Dwn
Metabolic process [GO:0008152]	39/99/192/32/70	1.97E-02		5.28E-04	5.57E-02	7.80E-02	6.11E-02
Oxidation-reduction process [GO:0055114]	29/139/47	3.61E-03			3.02E-04		3.30E-02
Ion transport [GO:0006811]	11	1.65E-02					
Transmembrane transport [GO:0055085]	11	9.23E-02					
Nitrate metabolic process [GO:0042126]	1	4.18E-02					
Nitrogen cycle metabolic process [GO:0071941]	1	5.54E-02					
Cobalamin metabolic process [GO:0009235]	1	4.18E-02					
Carbohydrate metabolic process [GO:0005975]	13/23/50		2.38E-02	8.14E-03	7.11E-04		
Lipid metabolic process [GO:0006629]	10/11		1.09E-02				6.60E-02
DNA metabolic process [GO:0006259]	9		7.27E-03				
Polysaccharide metabolic process [GO:0005976]	4		2.03E-02				
Fatty acid metabolic process [GO:0006631]	4		2.84E-02				
Glycogen metabolic process [GO:0005977]	2		1.46E-02				
Energy reserve metabolic process [GO:0006112]	2		1.46E-02				
Trehalose metabolic process [GO:0005991]	2		5.46E-02				
Oxidation-reduction process [GO:0055114]	61			7.28E-03			
Phosphorylation [GO:0016310]	41/12			8.56E-07		2.26E-02	
Response to stimulus [GO:0050896]	36			8.38E-02			
Carboxylic acid metabolic process [GO:0019752]	24/10			1.02E-03		8.23E-03	
Regulation of hydrolase activity [GO:0051336]	8			1.34E-02			
Response to chemical [GO:0042221]	39				8.55E-03		
Cellular detoxification [GO:1990748]	33				4.42E-05		
Response to oxidative stress [GO:0006979]	29/9				3.17E-04		6.58E-02
Reproductive process [GO:0022414]	2				8.70E-02		
Response to water deprivation [GO:0009414]	1					8.39E-02	
ATP generation from ADP [GO:0006757]	4					1.46E-03	
Response to toxic substance [GO:0009636]	10						4.65E-02
Detoxification [GO:0098754]	10						4.65E-02

## 7.11 Agrupación de genes y dinámica de regulación durante el ciclo diurno

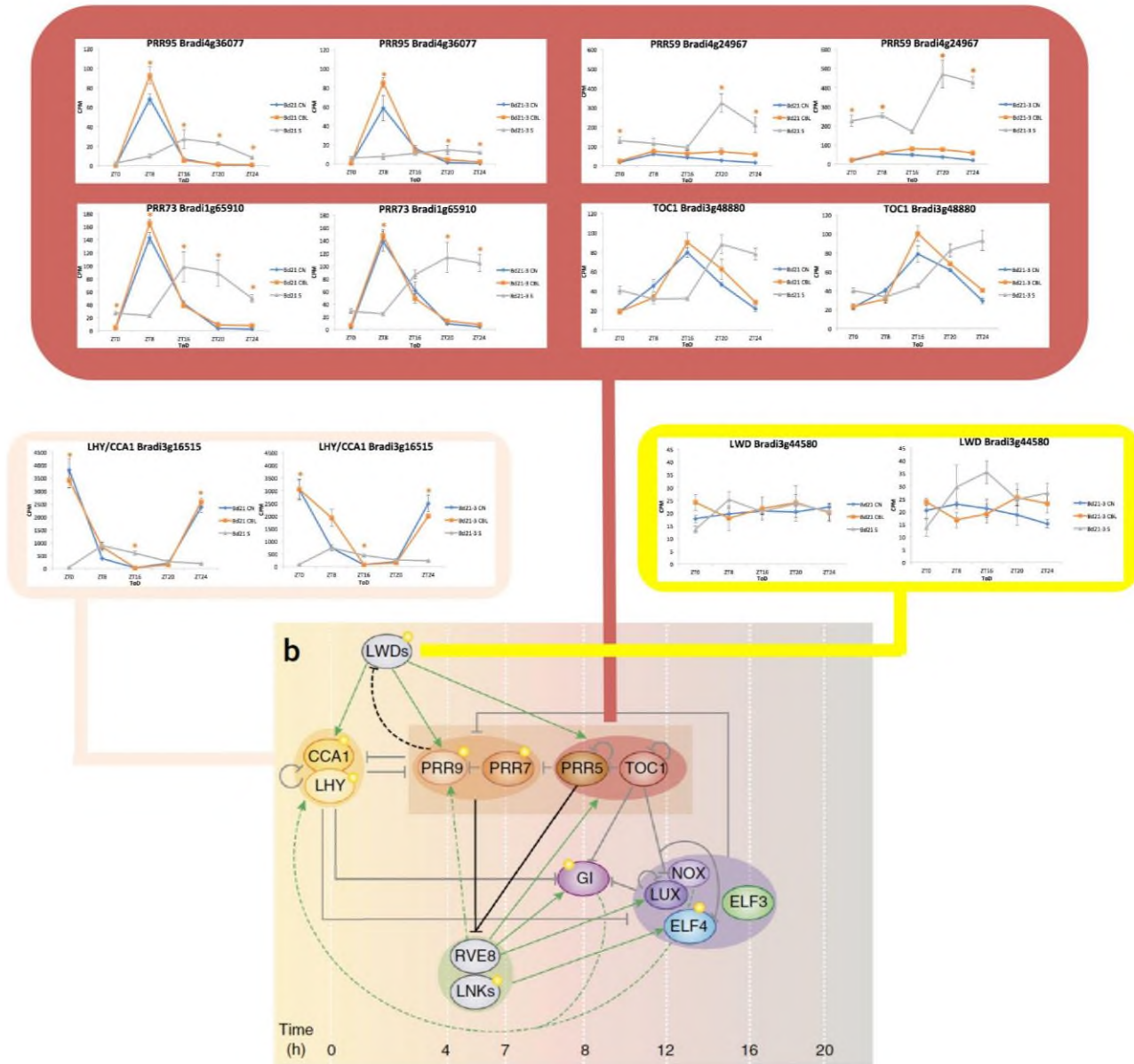
El análisis GO de 0h indicó que el regulador del medio día *GIGANTEA* (Bradi2g05226) estaba regulado positivamente en las plantas inundadas. Simultáneamente, el análisis GO indicó que el regulador circadiano nocturno *FKF1* estaba regulado positivamente en el amanecer. Con estos dos resultados, se reconstruyó el transcriptoma de todos los reguladores centrales del reloj circadiano en *Brachypodium* propuestos por MacKinnon *et al.* (2020) y se presentan en la Figuras 26 y 27.

Se observó que los componentes PRR del complejo vespertino (Evening Complex, EC) cambiaron su fase normal del mediodía a la noche donde además se regularon positivamente, en especial PRR59, el último componente de la cadena de represión. Estos genes del EC son los principales represores en cascada de los componentes matutinos, como *CCA1* (Nohales y Kay, 2016). En concordancia con lo anterior, la exploración manual del transcriptoma indicó que el regulador central matutino *CCA1* (Bradi3g16515) está fuertemente reprimido en la sumersión.

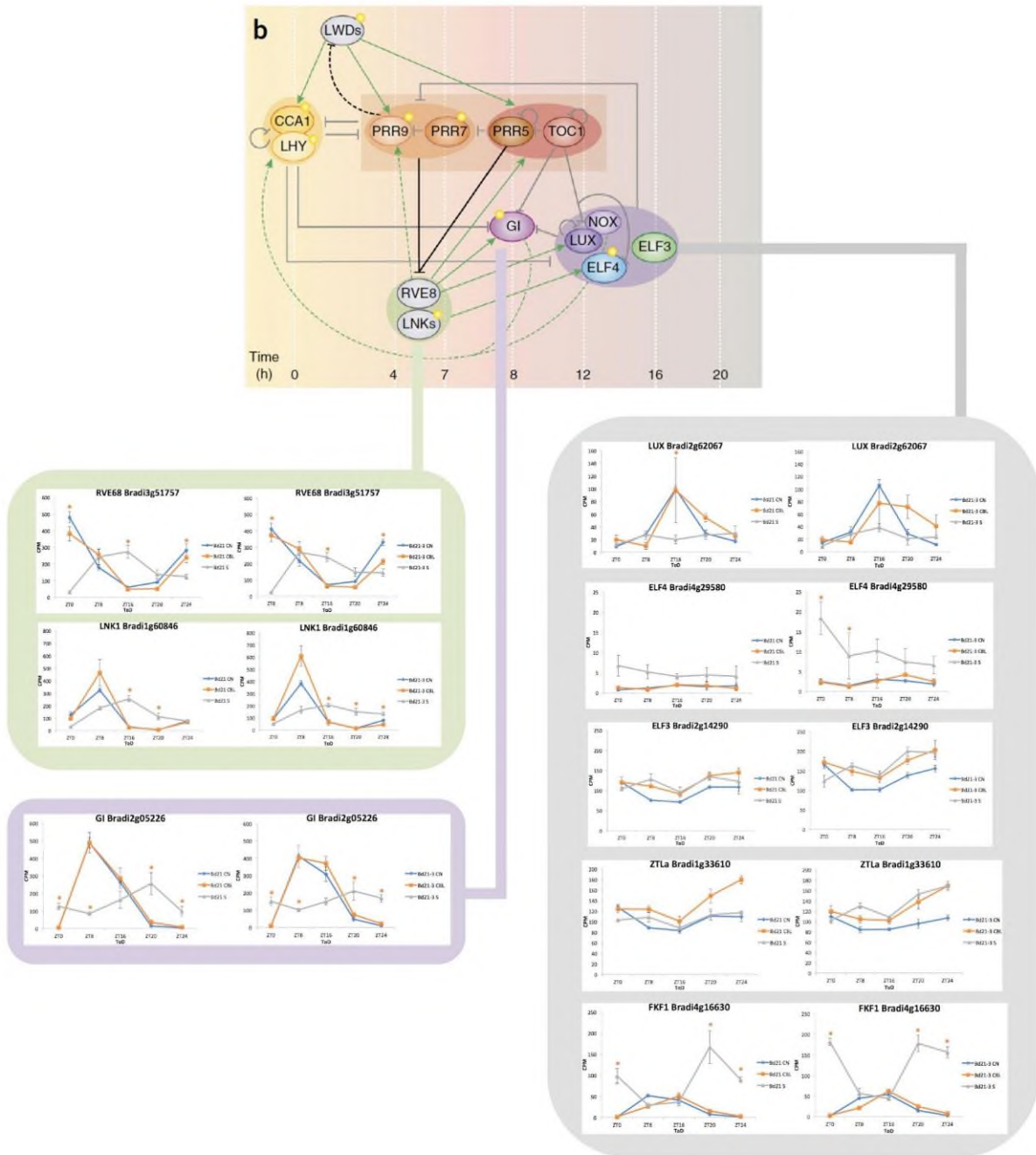
De tal manera, la regulación positiva del EC es congruente con la regulación negativa de los complejos más tempranos del día. Estos resultados indican que la hipótesis postulada en el presente trabajo se valida y que los reguladores genéticos del ciclo en sí mismos se ven afectados por la sumersión (Figura 26 y 27).

Los análisis GO previamente descritos, indicaron que el resultado de este reloj circadiano alterado (outputs) se puede encontrar en todas las horas examinadas, en diversos aspectos del desarrollo vegetal, y algunos son compartidos y otros son exclusivos de uno u otro ecotipo (Figura 28 y 29). En el amanecer se tiene una expresión de *TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE* aumentada que es congruente con una expresión vespertina de *TREHALASE*, indicando un estado de señalización por hambre aumentado por la noche que se elimina en el día (Peña-Castro., 2014). También en la mañana existe una regulación negativa de *ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE* y un aumento de *PYRUVATE KINASE*, en conjunto, ambos indican una limitación de la

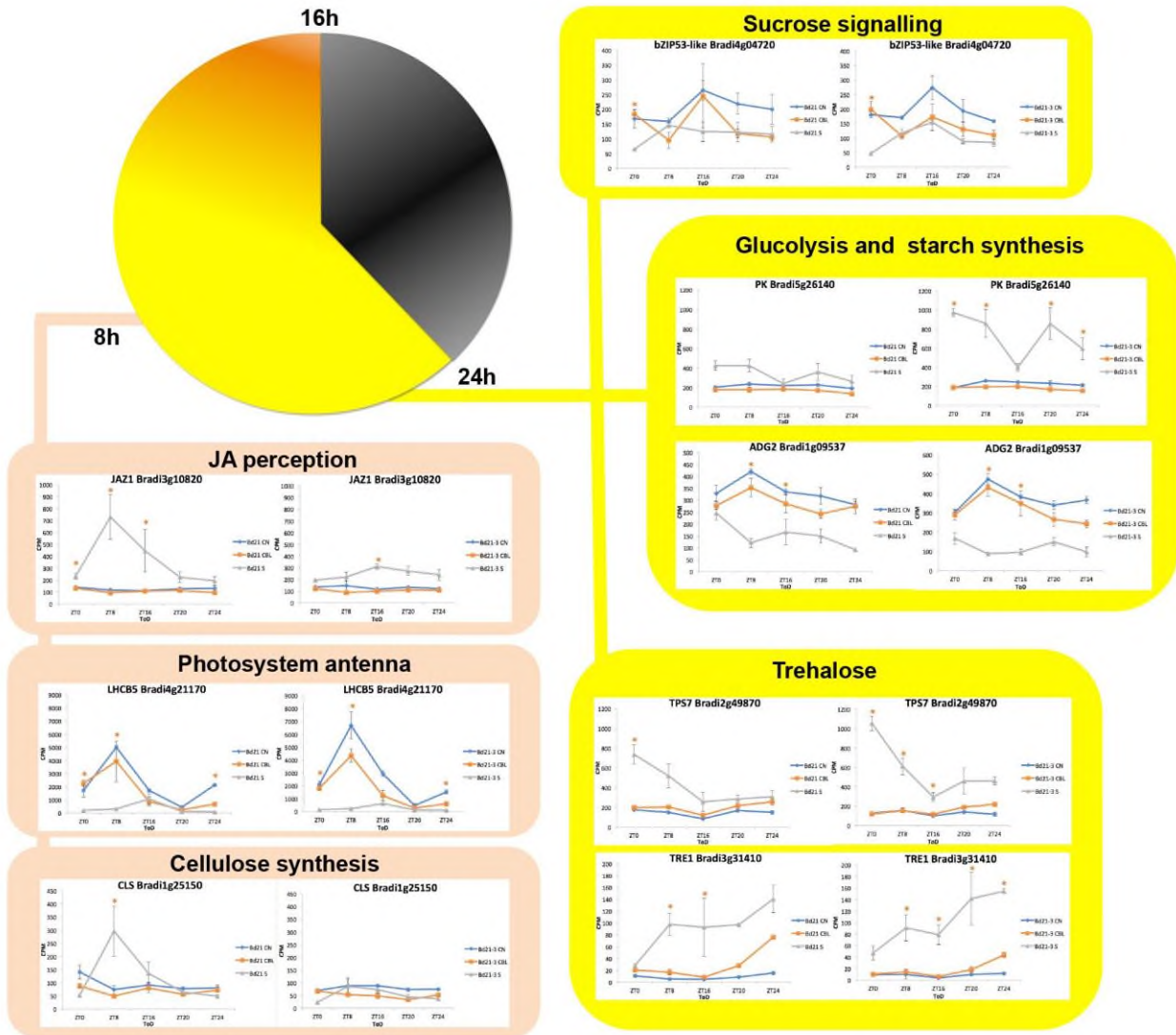
síntesis de almidón en ambos ecotipos, y un posible aumento en la glucólisis, este último exclusivo del ecotipo tolerante.



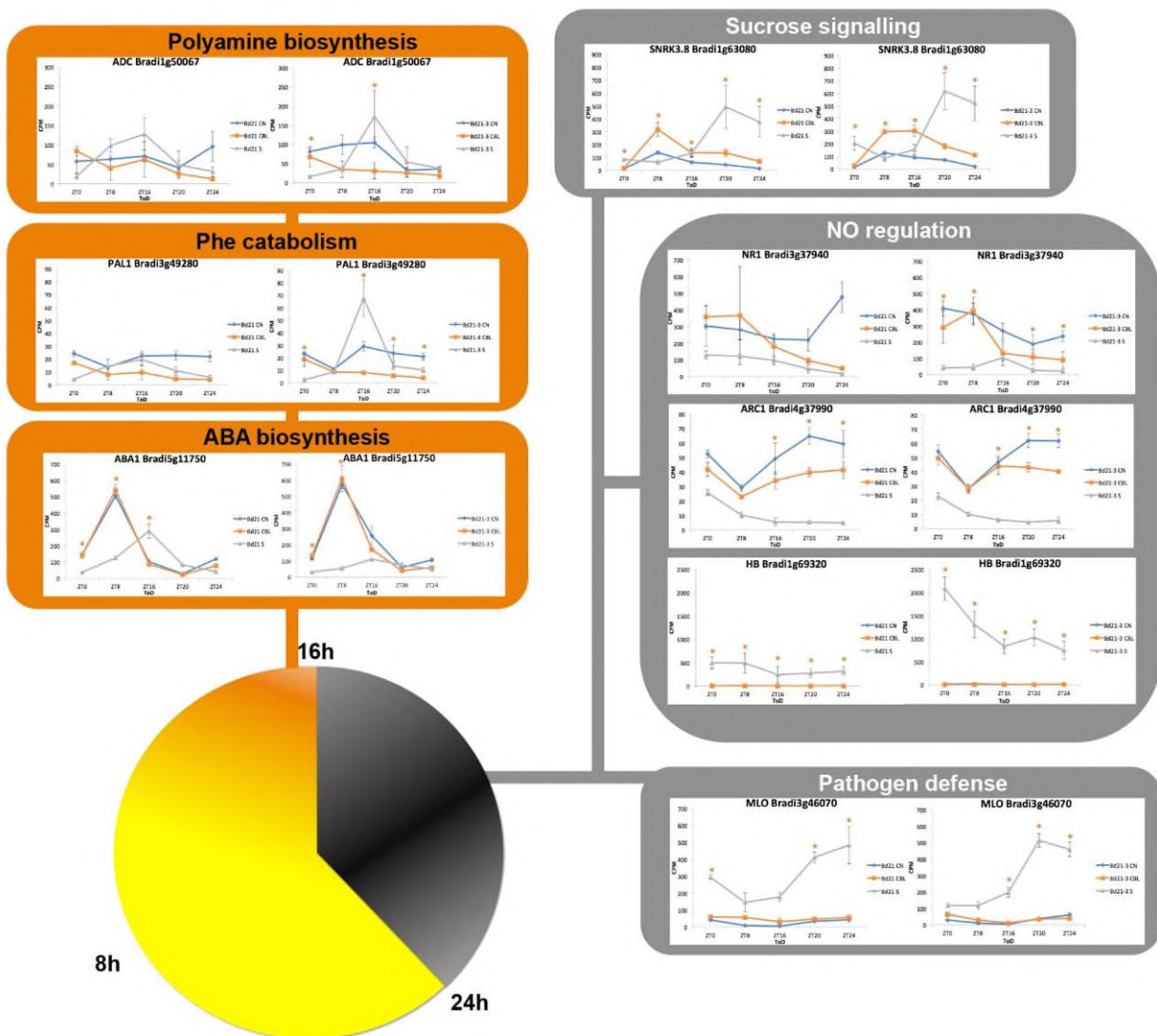
**Figura 26:** Regulación de genes involucrados en el Evening Complex (PRR, EC) durante el estrés por sumersión en *Brachypodium*. Se coloca el esquema de los reguladores circadianos de *Arabidopsis* (Nohales y Key, 2016). Los asteriscos naranjas indican diferencias significativas en cuentas por millón entre CBL y S.



**Figura 27:** Regulación de genes involucrados en el Night Complex (NC). Regulación de genes involucrados en el Night Complex (NC) de *Brachypodium*. Se coloca el esquema de los reguladores circadianos de *Arabidopsis* (Nohales y Key, 2016). Los asteriscos naranjas indican diferencias significativas en cuentas por millón entre CBL y S.



**Figura 28:** Outputs del ciclo circadiano, detectados como expresados diferencialmente en horas tempranas del día y durante la sumersión. Los asteriscos naranjas indican diferencias significativas en cuentas por millón entre CBL y S.



**Figura 29:** Outputs del ciclo circadiano detectados como expresados diferencialmente en horas tardías del día y en la noche durante la sumersión. Los asteriscos naranjas indican diferencias significativas en cuentas por millón entre CBL y S.

Al mediodía se observa una limitación transcripcional de mensajeros de antenas fotosintéticas en ambos ecotipos y un aumento de transcripción del receptor de ácido jasmonico (JA) y de la sintasa de celulosa en el ecotipo sensible Bd-21, no así en el tolerante Bd21-3, probablemente indicando un fortalecimiento de la quiescencia en este último. En la tarde, el ecotipo sensible Bd-21, muestra expresiones exclusivas de enzimas de síntesis de poliaminas como *ADC* y de polifenoles como *PAL1* y la posible limitación de la síntesis de la fitohormona *ABA* por la expresión disminuida de *ABA1*.

En la noche se observa la actividad en ambos ecotipos del transcrito de *SNRK3.8*, que es miembro de la familia de los reguladores negativos del consumo de carbohidratos *SnRKs* (Baena-González *et al.*, 2007) lo que concuerda con la hipótesis en el campo de la inundación de que los efectos de carencia nutricional normales de la noche se verían exacerbados por el estrés. También se confirma en este trabajo la relevancia del ciclo de la fitohormona NO que se reportó previamente (Rivera-Contreras *et al.*, 2016) al limitarse la expresión de la *NITRATE REDUCTASE* en el ecotipo tolerante y mayor expresión diferencial del gen de óxido-reducción *HEMOGLOBIN*. Adicionalmente, se registró la regulación negativa de su regulador *ARC1*. Estos tres transcritos forman parte de la maquinaria de control de NO (Fukao *et al.*, 2019). Finalmente, la expresión aumentada del transcrito de *MLO*, que es parte de la percepción de patógenos, indica un reforzamiento circadiano de la defensa contra patógenos que recientemente se ha reportado como parte crucial de los outputs del reloj circadiano vegetal (Kusch *et al.*, 2017).

## 8. CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que existe una diferencia fisiológica entre los ecotipos Bd-21 y Bd21-3 en lo que respecta a su tolerancia a la sumersión. Con los datos de supervivencia, porcentaje de daño causado en las hojas después del estrés generado por sumersión, y el análisis visual y cualitativo del periodo de post-sumersión, se determinó que Bd21-3 es el ecotipo que presenta una mayor tolerancia al estrés por sumersión con respecto al ecotipo Bd2-3 y aún más con el ecotipo Bd-21.

El análisis de RNA-seq nos permitió contrastar los transcriptomas de los ecotipos Bd21-3 y Bd-21 y visualizar por medio de los diagramas de Venn la dinámica de los genes diferenciales en cada uno de cinco puntos de colecta con criterios de calidad estándar para este tipo de experimentos.

La interpretación bioquímica de la expresión génica de cada una de las colectas nos brindó información sobre los genes que son regulados ya sea positivamente o negativamente, las probables funciones y actividades que realizan en la planta, y los diferentes mecanismos desplegados para enfrentarse a un estrés abiótico como la inundación. Estos resultados indicaron que el estrés por sumersión alteró la expresión diurna de cientos de mensajeros en comparación a las plantas control. Aunque una proporción de ellos fueron mensajeros de funciones desconocidas, de aquellos que sí tenían funciones anotadas se observó que los mensajeros centrales de la hipoxia no tienen una regulación diurna. No obstante, se observó un escenario complejo donde factores de transcripción, enzimas del metabolismo del nitrógeno y carbono, rutas de reciclado de ADP, y procesos de señalización del sistema inmune cambiaron su regulación diurna bajo estrés.

Los grupos de transcritos de cada ecotipo nos permitieron identificar ciertos conjuntos de genes que se expresan diferencialmente para que la planta desarrolle una respuesta de tolerancia, como se observó en Bd21-3, o sensible en el caso de Bd-21. Entre dichos genes se encontraron aquellos asociados a la regulación de nitrato reductasa (NR), bioquímica de aminoácidos aromáticos y síntesis de poliaminas.

Además, se logró identificar que, durante el estrés por sumersión, varios genes cambiaron de fase e intensidad de expresión. De especial interés fueron los genes del Evening Complex (*EC*), que son reguladores maestros del reloj circadiano. El resultado de estos cambios en el transcriptoma tolerante y sensible de *Brachypodium distachyon* tuvo resultados comunes ejemplificados por la señalización de trehalosa y carbohidratos, pero también características específicas como la represión de NR y celulosa sintasa en el ecotipo tolerante.

## 9. PERSPECTIVAS

Para continuar este trabajo de investigación es posible investigar la dinámica molecular de las rutas modificadas por el estrés por sumersión y que involucren al ciclo circadiano.

El análisis bioinformático de los datos de regulación de ambos ecotipos nos permitió tener un buen manejo de software especializado para el estudio de las ciencias ómicas en trabajos futuros. Además, como ya contamos con los datos bioinformáticos del análisis de RNA-seq de días completos en condiciones normales y condiciones de baja luz de *Brachypodium distachyon* de los ecotipos Bd-21 y Bd21-3, es posible dar un seguimiento a su expresión génica durante todo un día completo bajo esta condición.

Con la base de datos transcriptómica generada también es posible experimentar con mutantes y transgénicos que nos ayuden a identificar genes desconocidos, dinámicas de promotores y sus funciones.

## 10. REFERENCIAS

1. Babu S, Gassmann M. Assessing integrity of plant RNA with the Agilent 2100 Bioanalyzer. Application Note. (2011). Available at: <http://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8850EN.pdf>
2. Baek D, Kim WY, Cha JY, Park HJ, Shin G, Park J, Lim CJ, Chun HJ, Li N, Kim DH, Lee SY, Pardo JM, Kim MC, Yun DJ. The GIGANTEA-ENHANCED EM LEVEL Complex Enhances Drought Tolerance via Regulation of Abscisic Acid Synthesis. *Plant Physiol.* 2020 Sep;184(1):443-458.
3. Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature.* 2007 Aug 23;448(7156):938-42.
4. Bailey-Serres J, Voesenek LA. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol.* 2008;59:313-39.
5. Bailey-Serres J, Lee SC, Brinton E. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* 2012 Dec;160(4):1698-709.
6. Bailey-Serres J, Parker JE, Ainsworth EA, Oldroyd GED, Schroeder JI. Genetic strategies for improving crop yields. *Nature.* 2019 Nov;575(7781):109-118.
7. Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJ, Larive CK, Bailey-Serres J. Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2008 Dec;56(5):743-55.
8. Brauner K, Hörmiller I, Nägele T, Heyer AG. Exaggerated root respiration accounts for growth retardation in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2014 Jul;79(1):82-91.
9. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S; AmiGO Hub; Web Presence Working Group. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics.* 2009 Jan 15;25(2):288-9.
10. Chen C, He B, Liu X, Ma X, Liu Y, Yao HY, Zhang P, Yin J, Wei X, Koh HJ, Yang C, Xue HW, Fang Z, Qiao Y. Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-

- phosphotransferase (PFP1) regulates starch biosynthesis and seed development via heterotetramer formation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biotechnol J.* 2020 Jan;18(1):83-95.
11. Dar MH, Zaidi NW, Waza SA, Verulkar SB, Ahmed T, Singh PK, Roy SKB, Chaudhary B, Yadav R, Islam MM, Iftekharuddaula KM, Roy JK, Kathiresan RM, Singh BN, Singh US, Ismail AM. No yield penalty under favorable conditions paving the way for successful adoption of flood tolerant rice. *Sci Rep.* 2018 Jun 18;8(1):9245.
  12. Domínguez R, Carrizosa E, Arganis ML, Esquivel G, González C, Martínez E, Hincapié C. Diagnóstico de las inundaciones en México. Centro Nacional de Prevención de Desastres. México 2016.
  13. Dou L, Li Z, Shen Q, Shi H, Li H, Wang W, Zou C, Shang H, Li H, Xiao G. Genome-wide characterization of the WAK gene family and expression analysis under plant hormone treatment in cotton. *BMC Genomics.* 2021 Jan 28;22(1):85.
  14. Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge AP. *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.* 2001 Dec;127(4):1539-55.
  15. Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J. The submergence tolerance gene SUB1A delays leaf senescence under prolonged darkness through hormonal regulation in rice. *Plant Physiol.* 2012 Dec;160(4):1795-807.
  16. Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey-Serres J. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell.* 2006 Aug;18(8):2021-34.
  17. Fukao T, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM. Submergence and Waterlogging Stress in Plants: A Review Highlighting Research Opportunities and Understudied Aspects. *Front Plant Sci.* 2019 Mar 22; 10:340.

18. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue): D258-61.
19. Giorgi F, Raffaele F, Coppola E. The response of precipitation characteristics to global warming from climate projections. *Earth Syst. Dynam.*, 2019 Feb 10;73–89,
20. Girin T, David LC, Chardin C, Sibout R, Krapp A, Ferrario-Méry S, Daniel-Vedele F. *Brachypodium*: a promising hub between model species and cereals. *J Exp Bot.* 2014 Oct;65(19):5683-96.
21. Hellmuth S, Gómez-H L, Pendás AM, Stemmann O. Securin-independent regulation of separase by checkpoint-induced shugoshin-MAD2. *Nature.* 2020 Apr;580(7804):536-541.
22. Jiang J, Ma S, Ye N, Jiang M, Cao J, Zhang J. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *J Integr Plant Biol.* 2017 Feb;59(2):86-101.
23. Juntawong P, Bailey-Serres J. Dynamic Light Regulation of Translation Status in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2012 Apr 5; 3:66.
24. Kusch S, Panstruga R. mlo-Based Resistance: An apparently universal "weapon" to defeat powdery mildew disease. *Mol Plant Microbe Interact.* 2017 Mar;30(3):179-189.
25. Li M, Kennedy A, Huybrechts M, Dochy N, Geuten K. The Effect of Ambient Temperature on *Brachypodium distachyon* Development. *Front Plant Sci.* 2019 Aug 21; 10:1011.
26. MacKinnon KJ, Cole BJ, Yu C, Coomey JH, Hartwick NT, Remigereau MS, Duffy T, Michael TP, Kay SA, Hazen SP. Changes in ambient temperature are the prevailing cue in determining *Brachypodium distachyon* diurnal gene regulation. *New Phytol.* 2020 Sep;227(6):1709-1724.
27. Martínez Rodríguez JA, 2018. Aislamiento y caracterización de muestras mutantes de T-DNA en genes que codifican para factores de transcripción activos durante el estrés por inundación en *Brachypodium distachyon*. Tesis de Maestría, Universidad del Papaloapan.

28. Mendiondo GM, Gibbs DJ, Szurman-Zubrzycka M, Korn A, Marquez J, Szarejko I, Maluszynski M, King J, Axcell B, Smart K, Corbineau F, Holdsworth MJ. Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnol J*. 2016 Jan;14(1):40-50.
29. Mora, C., D. Spirandelli, E. C. Franklin, J. Lynham, M. B. Kantar, W. Miles, C. Z. Smith, et al. Broad threat to humanity from cumulative climate hazards intensified by greenhouse gas emissions. *Nature Clim. Change* 2018 8(12):1062-1071.
30. Mustroph A. Improving flooding tolerance of crop plants. *Agronomy*. 2018 8(9):160.
31. Mustroph A, Lee SC, Oosumi T, Zanetti ME, Yang H, Ma K, Yaghoubi-Masihi A, Fukao T, Bailey-Serres J. Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiol*. 2010 Mar;152(3):1484-500.
32. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2019. *Science Breakthroughs to Advance Food and Agricultural Research by 2030*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25059>.
33. Nohales MA, Kay SA. Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 Dec;23(12):1061-1069.
34. Ohara T, Hearn TJ, Webb AAR, Satake A. Gene regulatory network models in response to sugars in the plant circadian system. *J Theor Biol*. 2018 Nov 14; 457:137-151.
35. Peña-Castro JM, van Zanten M, Lee SC, Patel MR, Voesenek LA, Fukao T, Bailey-Serres J. Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. *Plant J*. 2011 Aug;67(3):434-46.
36. Peña-Castro JM. Plant molecular response to submergence stress: lessons from SUB1A Gene. *Revista Fitotecnia Mex* 2014 37 (4): 325-337.

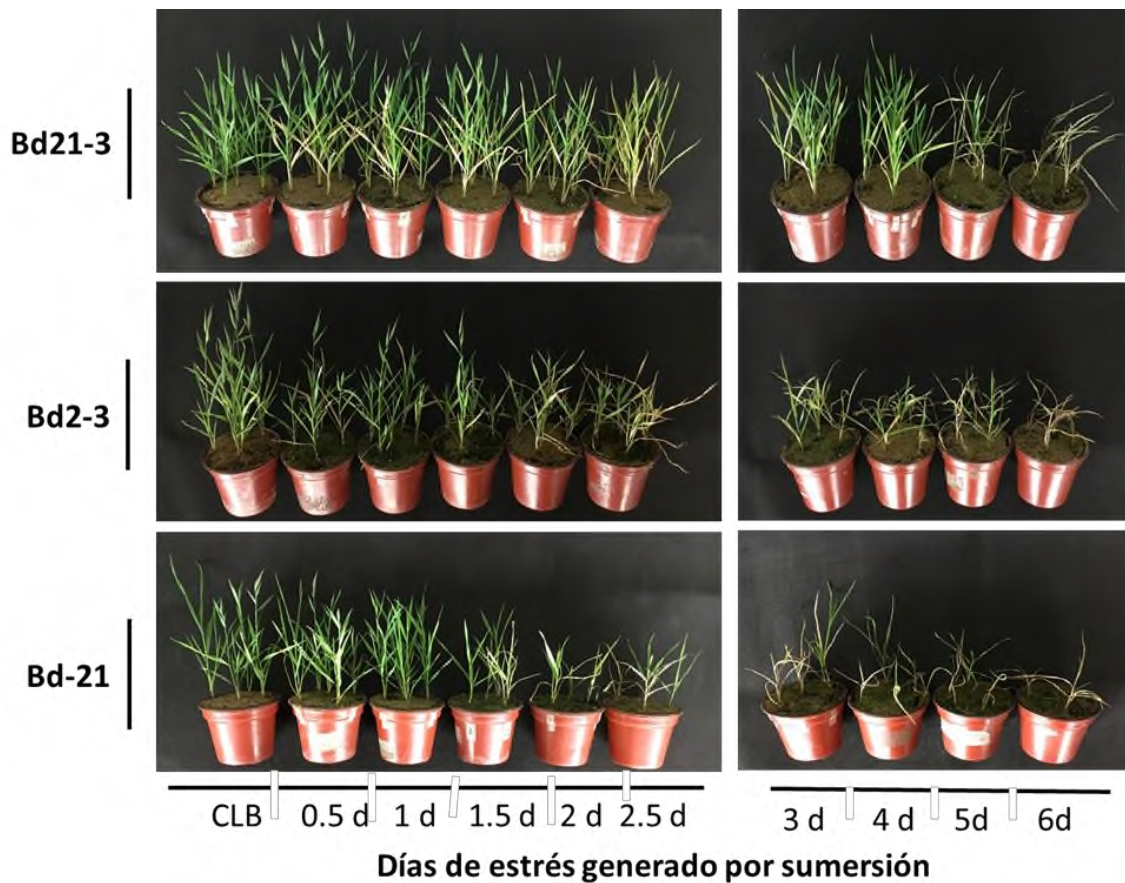
37. Pucciariello C, Perata P. Quiescence in rice submergence tolerance: an evolutionary hypothesis. *Trends Plant Sci.* 2013 jul;18(7):377-81.
38. Rivera-Contreras IK, Zamora-Hernández T, Huerta-Heredia AA, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM. Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Sci Rep.* 2016 Jun 10; 6:27686.
39. Salas MA, Jiménez M. Serie fasciculos: Inundaciones. Centro Nacional de Prevención de Desastres. México 2004.
40. Saldaña-Zorrilla SO, Sandberg K. Spatial econometric model of natural disaster impacts on human migration in vulnerable regions of Mexico. *Disasters.* 2009 Oct;33(4):591-607.
41. Sasidharan R, Hartman S, Liu Z, Martopawiro S, Sajeev N, van Veen H, Yeung E, Voeselek LACJ. Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiol.* 2018 Feb;176(2):1106-1117.
42. Scholthof KBG, Irigoyen S, Catalan P, Mandadi KK. *Brachypodium*: A Monocot Grass Model Genus for Plant Biology. *Plant Cell.* 2018 Aug;30(8):1673-1694.
43. Seki M, Ohara T, Hearn TJ, Frank A, da Silva VCH, Caldana C, Webb AAR, Satake A. Adjustment of the Arabidopsis circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism. *Sci Rep.* 2017 Aug 16;7(1):8305.
44. Slangen A. How humans and rising seas affect each other. *Nature.* 2018 Jun;558(7709):196-197.
45. Tsai KJ, Lin CY, Ting CY, Shih MC. Ethylene-Regulated Glutamate Dehydrogenase fine-tunes metabolism during anoxia-reoxygenation. *Plant Physiol.* 2016 nov;172(3):1548-1562.
46. Vega-Serratos BE, Domínguez-Mora R, Posada-Vanegas G. Evaluación estacional del riesgo por inundación en zonas agrícolas. *Tecnología y Ciencias del Agua* 2013 9(3) epub 2018-03-04.

47. Voesenek LACJ, Bailey-Serres J. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytol.* 2015 Apr;206(1):57-73.
48. Voesenek LA, Sasidharan R, Visser EJ, Bailey-Serres J. Flooding stress signaling through perturbations in oxygen, ethylene, nitric oxide and light. *New Phytol.* 2016 Jan;209(1):39-43.
49. Waters CN, Zalasiewicz J, Summerhayes C, Barnosky AD, Poirier C, Galuszka A, Cearreta A, Edgeworth M, Ellis EC, Ellis M, Jeandel C, Leinfelder R, McNeill JR, Richter Dd, Steffen W, Syvitski J, Vidas D, Wagreich M, Williams M, Zhisheng A, Grinevald J, Odada E, Oreskes N, Wolfe AP. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science.* 2016 Jan 8;351(6269): aad2622.
50. Webb AAR, Seki M, Satake A, Caldana C. Continuous dynamic adjustment of the plant circadian oscillator. *Nat Commun.* 2019 Feb 1;10(1):550.
51. Wen Z, Mei Y, Zhou J, Cui Y, Wang D, Wang NN. SAUR49 Can Positively Regulate Leaf Senescence by Suppressing SSPP in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2020 Mar 1;61(3):644-658.
52. van Veen H, Vashisht D, Akman M, Girke T, Mustroph A, Reinen E, Hartman S, Kooiker M, van Tienderen P, Schranz ME, Bailey-Serres J, Voesenek LA, Sasidharan R. Transcriptomes of Eight Arabidopsis thaliana Accessions Reveal Core Conserved, Genotype- and Organ-Specific Responses to Flooding Stress. *Plant Physiol.* 2016 Oct;172(2):668-689.
53. Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature.* 2006 Aug 10;442(7103):705-8.
54. Yeung E, van Veen H, Vashisht D, Sobral Paiva AL, Hummel M, Rankenberg T, Steffens B, Steffen-Heins A, Sauter M, de Vries M, Schuurink RC, Bazin J, Bailey-Serres J, Voesenek LACJ, Sasidharan R. A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jun 26;115(26):E6085-E6094.

55. Yeung E, Bailey-Serres J, Sasidharan R. After the deluge plant revival post-flooding. *Trends Plant Sci.* 2019 May;24(5):443-454.
56. Yuan N, Balasubramanian VK, Chopra R, Mendu V. The photoperiodic flowering time regulator FKF1 negatively regulates cellulose biosynthesis. *Plant Physiol.* 2019 Aug;180(4):2240-2253.
57. Zamora Hernández, T., 2018. Aislamiento y caracterización de muestras mutantes de T-DNA en genes que codifican para factores de transcripción activos durante el estrés por inundación en *Brachypodium distachyon*. Tesis de Maestría, Universidad del Papaloapan.
58. Zhang H, Yu Z, Yao X, Chen J, Chen X, Zhou H, Lou Y, Ming F, Jin Y. Genome-wide identification and characterization of small auxin-up RNA (SAUR) gene family in plants: evolution and expression profiles during normal growth and stress response. *BMC Plant Biol.* 2021 Jan 6;21(1):4.
59. Zhao K, Ma B, Xu Y, Stirling E, Xu J. Light exposure mediates circadian rhythms of rhizosphere microbial communities. *ISME J.* 2021 Sep;15(9):2655-2664.

## ANEXO 1.

Primer ensayo de sumersión, se pueden observar en la Figura I Control de baja luz (CBL) y los diferentes tiempos de estés por sumersión (0.5d, 1d, 1.5d, 2d, 2.5d, 3d, 4d, 5d y 6d.



**Figura 30:** Primer ensayo de sumersión para la evaluación de tolerancia de los ecotipos Bd21-3, Bd2-3 y Bd-21. Se muestran las plantas correspondientes al, CBL (Control de Baja Luz) y a los 0.5d, 1d, 1.5d, 2d, 2.5d, 3d, 4d, 5d y 6d de estrés generado por sumersión.

## ANEXO 2

### ***Condiciones Optimizadas; Experimentos de sumersión respuestas interesantes sobre cambios de temperatura***

En experimentos realizados que no fueron contemplados para el análisis del porcentaje de daño en hojas, se obtuvieron datos interesantes. Uno de ellos se presentó en relación a la disminución accidental de la temperatura del cuarto de cultivo de 23°C a 19°C. En consecuencia, las plantas no presentaron ningún tipo de daño hasta el día 6, y no murió ninguna planta a ningún tiempo de estrés de ninguno de los tres ecotipos. Lo anterior coincide con lo actualmente reportando por Li *et al.*, 2019 en donde explica que una temperatura fría de 18°C extiende la duración del ciclo de vida, mientras que una temperatura ambiente cálida de 26°C acorta su ciclo de vida en los diferentes ecotipos de *Brachypodium distachyon*. Es por ello que en nuestros experimentos cuando la temperatura disminuyó, no observamos ningún tipo de síntoma de estrés en las plantas (Figura 26).

Ante el actual cambio climático un aumento o descenso en un par de grados centígrados puede afectar severamente a los cultivos de cereales templados de mayor importancia económica como el trigo y la cebada. Es decir, la temperatura es considerada un factor importante para el desarrollo de las plantas, así como para la visualización de respuestas fisiológicas y moleculares ante la presencia de estrés abiótico.

De esta manera, se trabajó en recalibrar los aires acondicionados del cuarto de cultivo con el monitoreo diariamente en tres momentos del día (en la mañana al inicio de las actividades, a media tarde y en la noche al finalizar las actividades del día), y que se tuvieran temperaturas en un rango de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , para que las plantas crezcan en las condiciones previas. Se realizó un ensayo de sumersión de reconocimiento donde se buscaba nuevamente un tiempo idóneo para observar un estrés por sumersión este experimento se planificó durante 18 d de estrés en donde se evaluaron los tres ecotipos con tiempos de rescate fraccionados cada dos días.

Los resultados del día 2 son visualmente similares al experimento original, indicando que se recalibró la temperatura del cuarto de crecimiento.

### ***Experimentos de sumersión, respuestas interesantes sobre la densidad de plantas***

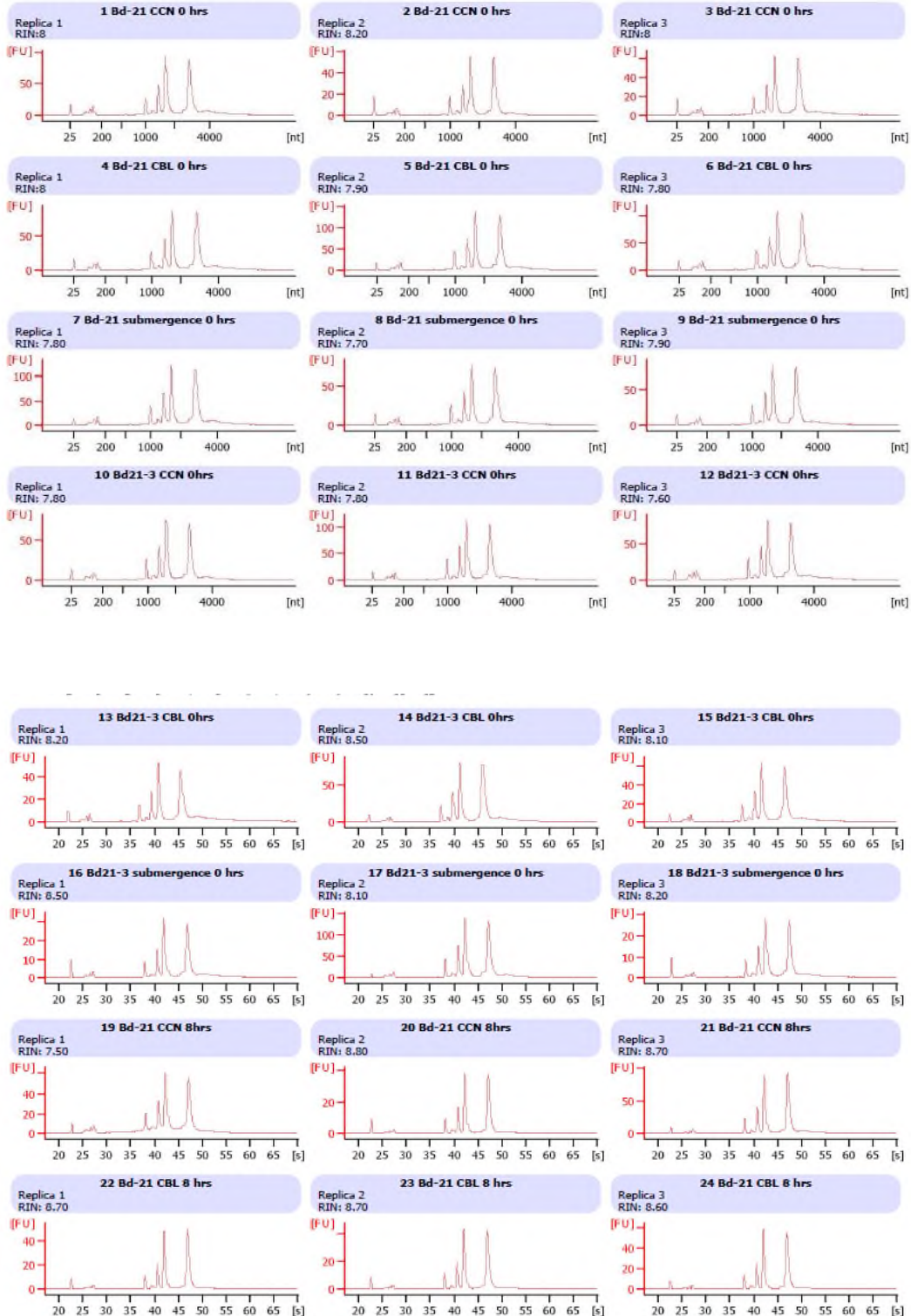
Con respecto a los experimentos realizados en donde disminuyó la densidad de las plantas y que no se usaron en los análisis estadísticos del trabajo, se encontró que en los ecotipos analizados Bd21-3 y Bd-21 las plantas no presentan daños tan severos de estrés. Cabe aclarar que las plantas se sometieron a los mismos tiempos de estrés que los anteriores experimentos y que las condiciones experimentales fueron las mismas que en los experimentos anteriores salvo la densidad menor de plantas. Se propone que, al haber menos plantas, se agota menos rápido el O<sub>2</sub> disuelto en el agua, en especial en la noche.

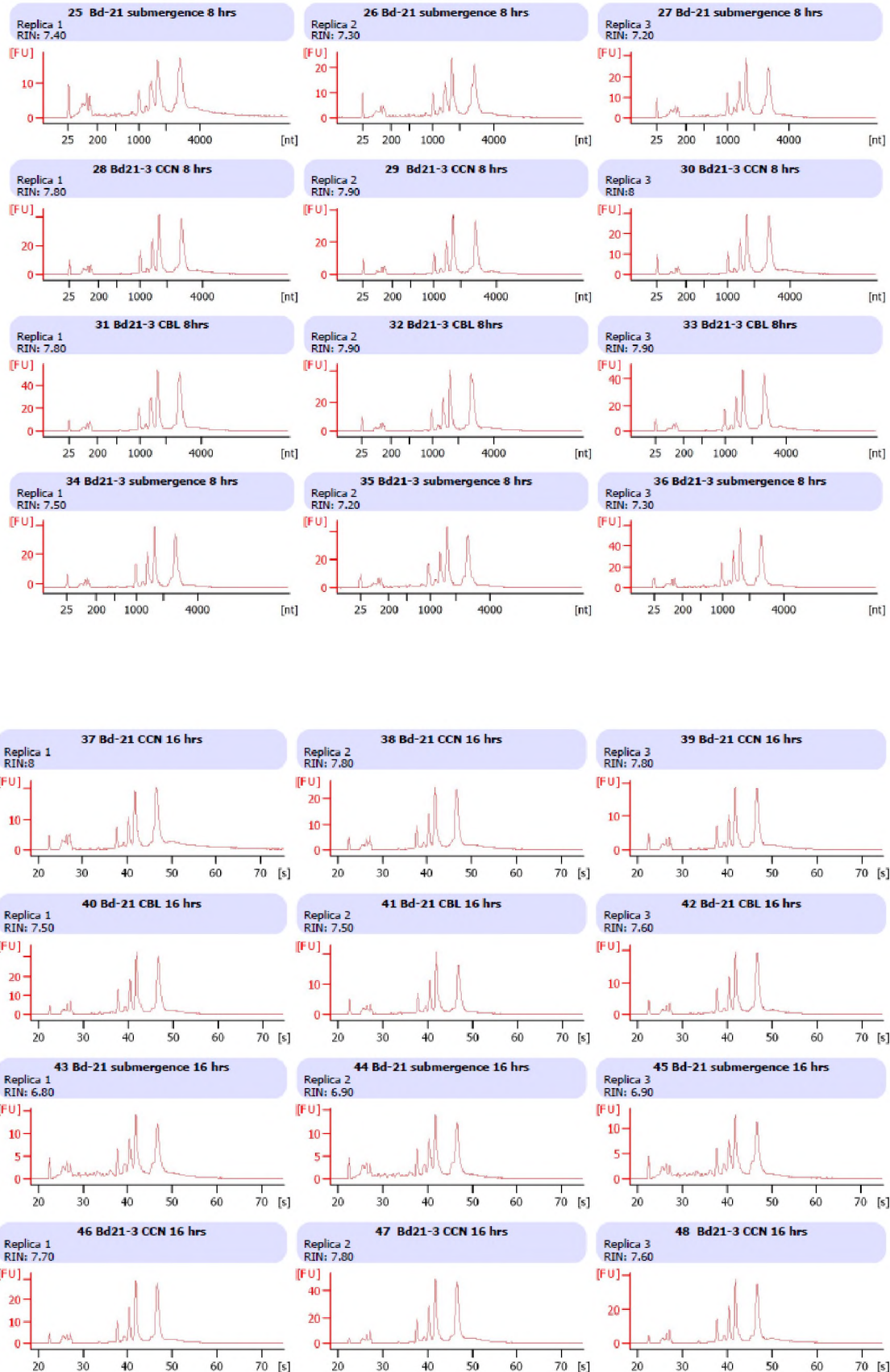


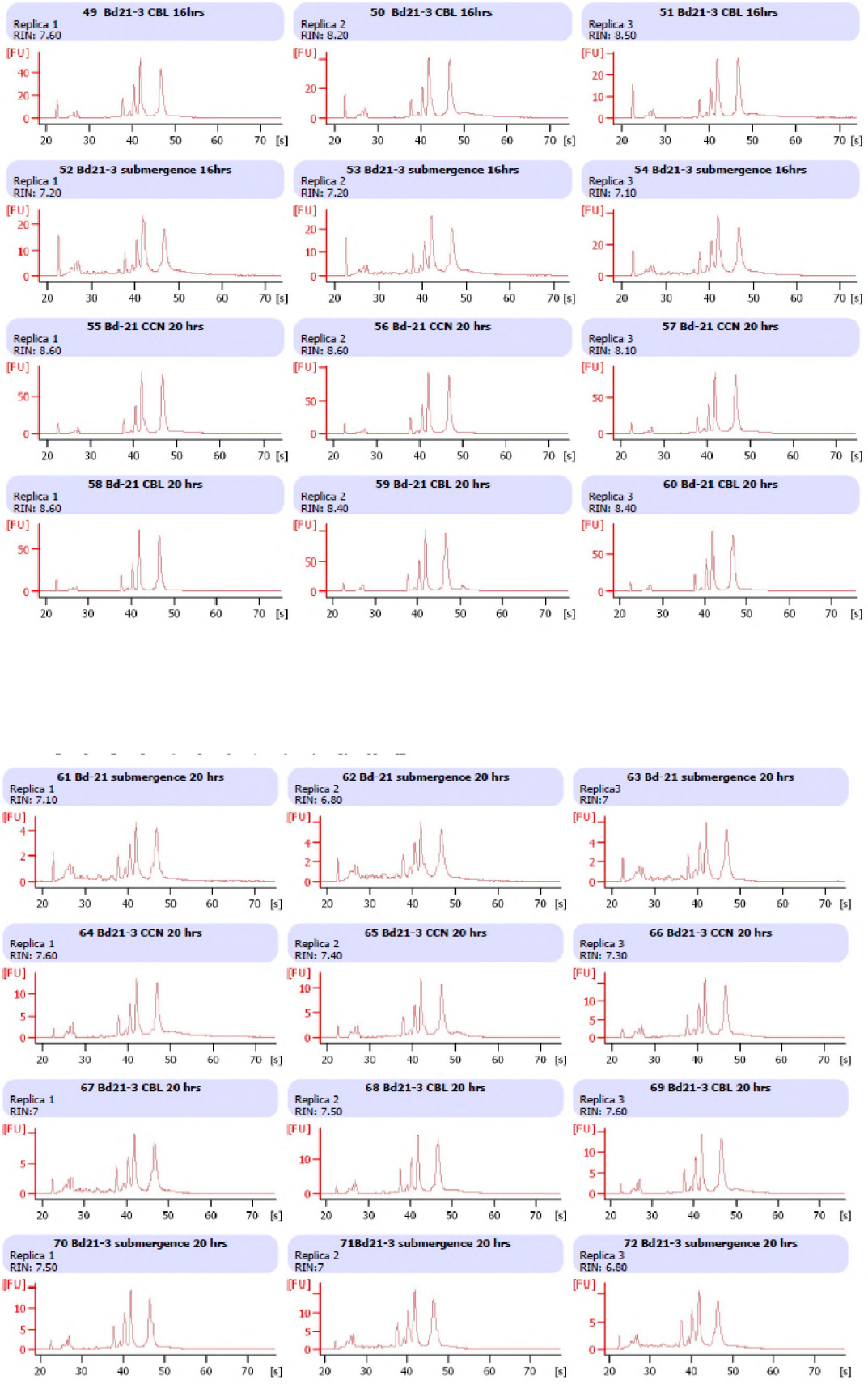
**Figura 31:** Respuesta de las plantas inundadas en temperaturas menores. Se observan las plantas correspondientes a un ensayo de sumersión donde se vio afectada la temperatura del cuarto de cultivo, al presentar una disminución de 23°C a 19°C. Ninguno de los tres ecotipos presenta ningún síntoma de estrés por sumersión aun después de los 6 d de recuperación.

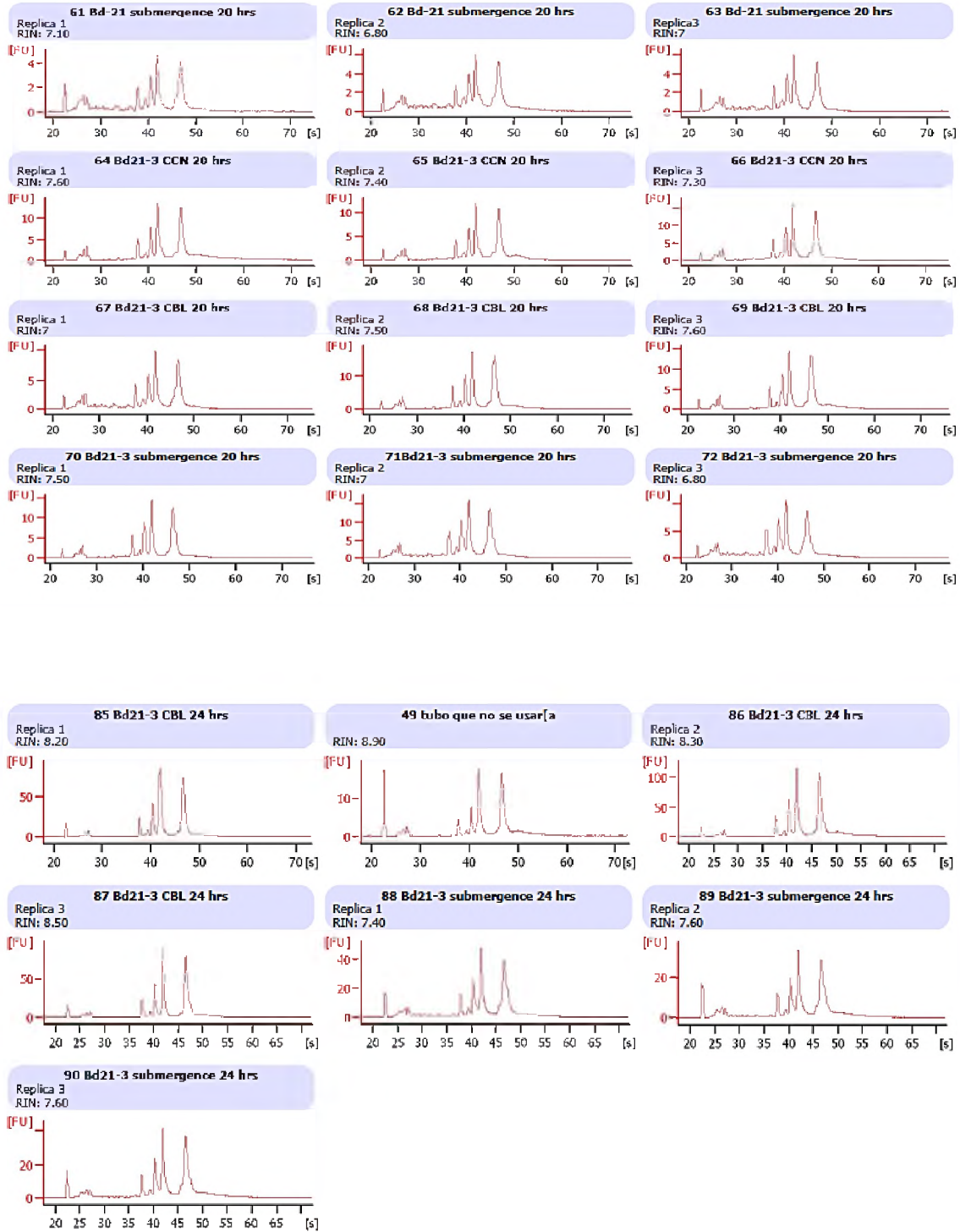
# ANEXO 3

## Cálculo de RIN de las 90 muestras colectadas.









## ANEXO 4

**Tabla 8:** Información de librerías, las 90 bibliotecas secuenciadas mediante el análisis RNA-seq. Se indican el número de resecuenciación, en negritas se identifica que solo fue necesario la primera secuenciación ya que el valor de número de lecturas satisfactorio  $\geq 15$  millones. Si se encuentran identificadas de color azul indican que fue necesario la suma de las tres secuenciaciones para poder obtener un valor satisfactorio  $\geq 15$  millones. El color amarillo indica que en alguna de las secuenciaciones se obtuvo un valor mayor que el obtenido en las otras dos secuenciaciones, en la fila identificada como total se encuentra cual fue el número de lecturas utilizadas para realizar el análisis bioinformático de cada una de las 90 bibliotecas secuenciadas.

Tiempo de colecta	Condición	Número de Bibliotecas	Número de lecturas			Total
			Carpeta 1	Carpeta 2	Carpeta 3	
0h	Bd-21CN	<b>1</b>	<b>18,908,144</b>			<b>18,908,144</b>
		<b>2</b>	<b>21,144,411</b>			<b>21,144,411</b>
		<b>3</b>	12,256,318	2,468,032	9,577,553	<b>24,301,903</b>
	Bd-21C	<b>4</b>	4,586,808	3,563,109	5,971,629	<b>14,121,546</b>
		<b>5</b>	8,532,837	3,328,923	14,123,911	<b>25,985,671</b>
		<b>6</b>	<b>17,596,883</b>			<b>17,596,883</b>
	Bd-21S	<b>7</b>	<b>18,293,988</b>			<b>18,293,988</b>
		<b>8</b>	15,348,885	5,418,422		<b>20,767,307</b>
		<b>9</b>	13,855,806	5,504,882		<b>19,360,688</b>
	Bd21-3CN	<b>10</b>	14,154,087	6,319,332		<b>20,473,419</b>
		<b>11</b>	<b>18,323,313</b>			<b>18,323,313</b>
		<b>12</b>	<b>23,478,709</b>			<b>23,478,709</b>
	Bd21-3C	<b>13</b>	<b>29,706,574</b>			<b>29,706,574</b>
		<b>14</b>	13,926,187	5,066,331		<b>18,992,518</b>
		<b>15</b>	16,248,755	5,987,001		<b>22,235,756</b>
	Bd21-3S	<b>16</b>	<b>19,908,558</b>			<b>19,908,558</b>
		<b>17</b>	8,497,647	3,074,062	1,676,042	<b>13,247,751</b>
		<b>18</b>	<b>21,616,130</b>			<b>21,616,130</b>

<b>8h</b>	Bd-21CN	<b>19</b>	<b>24,237,816</b>			<b>24,237,816</b>	
		<b>20</b>	<b>23,373,975</b>			<b>23,373,975</b>	
		<b>21</b>	<b>19,357,241</b>			<b>19,357,241</b>	
	Bd-21C	<b>22</b>	<b>28,190,873</b>			<b>28,190,873</b>	
		<b>23</b>	15,719,223	4,624,800		<b>20,344,023</b>	
		<b>24</b>	16,715,446	5,708,835		<b>22,424,281</b>	
	Bd-21S	<b>25</b>	3,912,839	2,280,241	4,675,109	<b>10,868,189</b>	
		<b>26</b>	<b>19,880,070</b>			<b>19,880,070</b>	
		<b>27</b>	<b>19,422,595</b>			<b>19,422,595</b>	
	Bd21-3CN	<b>28</b>	<b>18,449,831</b>			<b>18,449,831</b>	
		<b>29</b>	<b>20,272,192</b>			<b>20,272,192</b>	
		<b>30</b>	<b>19,574,249</b>			<b>19,574,249</b>	
	Bd21-3C	<b>31</b>	12,253,805	5,067,353		<b>17,321,158</b>	
		<b>32</b>	<b>22,474,106</b>			<b>22,474,106</b>	
		<b>33</b>	<b>15,046,415</b>	4,592,268		<b>19,638,683</b>	
	Bd21-3S	<b>34</b>	<b>20,593,095</b>			<b>20,593,095</b>	
		<b>35</b>	<b>21,874,193</b>			<b>21,874,193</b>	
		<b>36</b>	<b>18,175,011</b>			<b>18,175,011</b>	
	<b>16h</b>	Bd-21CN	<b>37</b>	<b>17,488,798</b>			<b>17,488,798</b>
			<b>38</b>	7,366,527	2,565,855	24,141,347	<b>34,073,729</b>
			<b>39</b>	13,720,910	5,086,361		<b>18,807,271</b>
		Bd-21C	<b>40</b>	16,170,833	5,551,801		<b>21,722,634</b>
			<b>41</b>	10,810,16	3,096,018	12,925,908	<b>16,021,926</b>
			<b>42</b>	<b>25,167,849</b>			<b>25,167,849</b>
		Bd-21S	<b>43</b>	<b>19,472,029</b>			<b>19,472,029</b>
			<b>44</b>	<b>18,767,383</b>			<b>18,767,383</b>
			<b>45</b>	<b>19,291,887</b>			<b>19,291,887</b>
		Bd21-3CN	<b>46</b>	13,740,049	7,764,419		<b>21,504,468</b>
			<b>47</b>	15,094,550	7,611,264		<b>22,705,814</b>
			<b>48</b>	13,800,952	7,241,340		<b>21,042,292</b>
		Bd21-3C	<b>49</b>	13,356,904	7,818,393		<b>21,175,297</b>
			<b>50</b>	13,005,366	6,528,729		<b>19,534,095</b>
			<b>51</b>	12,189,736	7,393,053		<b>19,582,789</b>
		Bd21-3S	<b>52</b>	11,938,417	4,181,550	7,971,947	<b>24,091,914</b>
			<b>53</b>	15,884,740	7,032,626		<b>22,917,366</b>
			<b>54</b>	14,682,110	7,637,666		<b>22,319,776</b>
<b>20h</b>		Bd-21CN	<b>55</b>	13,565,051	23,643	10,075,019	<b>23,640,070</b>
			<b>56</b>	13,596,659	7,731,059		<b>21,327,718</b>
			<b>57</b>	3,413,619	10,780,082		<b>14,193,701</b>
		Bd-21C	<b>58</b>	14,052,271	7,032,544		<b>21,084,815</b>
			<b>59</b>	14,758,430	10,113,942		<b>24,872,372</b>

		<b>60</b>	14,153,261	7,481	9,798,083	<b>23,951,344</b>
	Bd-21S	<b>61</b>	<b>17,023,384</b>			<b>17,023,384</b>
		<b>62</b>	9,591,746	16,070,151		<b>25,661,897</b>
		<b>63</b>	16,548,499	<b>21,349,646</b>		<b>37,898,145</b>
	Bd21-3CN	<b>64</b>	16,251,696	8,692,696		<b>24,944,392</b>
		<b>65</b>	<b>18,112,689</b>			<b>18,112,689</b>
		<b>66</b>	<b>20,476,320</b>			<b>20,476,320</b>
	Bd21-3C	<b>67</b>	13,106,356	9,713,794		<b>22,820,150</b>
		<b>68</b>	<b>18,089,562</b>			<b>18,089,562</b>
		<b>69</b>	<b>19,517,299</b>			<b>19,517,299</b>
	Bd21-3S	<b>70</b>	16,053,570	7,294,089		<b>23,347,659</b>
		<b>71</b>	15,143,889	7,013,013		<b>22,156,902</b>
<b>72</b>		<b>17,126,687</b>			<b>17,126,687</b>	
<b>24h</b>	Bd-21CN	<b>73</b>	7,251,243	4,229,601	8,726,619	<b>20,207,463</b>
		<b>74</b>	<b>19,905,071</b>			<b>19,905,071</b>
		<b>75</b>	<b>19,526,550</b>			<b>19,526,550</b>
	Bd-21C	<b>76</b>	<b>18,725,568</b>			<b>18,725,568</b>
		<b>77</b>	<b>24,104,254</b>			<b>24,104,254</b>
		<b>78</b>	96,635	231,461	159,314	<b>487,410</b>
	Bd-21S	<b>79</b>	<b>31,106,491</b>			<b>31,106,491</b>
		<b>80</b>	<b>24,587,619</b>			<b>24,587,619</b>
		<b>81</b>	13,532,673	5,984,553		<b>19,517,226</b>
	Bd21-3CN	<b>82</b>	<b>24,259,208</b>			<b>24,259,208</b>
		<b>83</b>	<b>19,169,616</b>			<b>19,169,616</b>
		<b>84</b>	<b>19,180,409</b>			<b>19,180,409</b>
	Bd21-3C	<b>85</b>	<b>17,862,912</b>			<b>17,862,912</b>
		<b>86</b>	16,254,009	7,933,455		<b>24,187,464</b>
		<b>87</b>	17,032,635	8,896,774		<b>25,929,409</b>
	Bd21-3S	<b>88</b>	<b>19,193,514</b>			<b>19,193,514</b>
		<b>89</b>	13,838,727	9,599,411		<b>23,438,138</b>
		<b>90</b>	<b>18,329,317</b>			<b>18,329,317</b>

## ANEXO 5.

### ***Descripción de Brachypodium distachyon.***

*Brachypodium distachyon*, es una planta anual de clima templado, perteneciente a la familia de las gramíneas (*Poaceae*), nativa de Medio Oriente y sur de Europa, fue propuesta como planta modelo idónea (Girin *et al.*, 2014; Scholthrof *et al.*, 2018) para realizar investigaciones genómicas debido a que presenta las características principales de ciclo de vida corto, fácil manejo y mantenimiento, posee un genoma pequeño de 5 cromosomas, es una planta monocotiledónea con alta sintenia presentando regiones altamente conservadas en su genoma que facilitan el entendimiento de diversos mecanismos de regulación ante diversos procesos de estrés, en cultivos de alto interés económico como las gramíneas domesticadas, que proporcionan el 50% de la ingesta calórica humana como; el arroz (*Oryza sativa*), cebada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum ssp*), maíz (*Zea mays*) y caña de azúcar (*Saccharum ssp*) (Figura 29) (Draper *et al.*, 2001)



**Figura 32:** Fisiología de *Brachypodium distachyon*. Se presenta el ecotipo Bd2-3 con una edad de 38 d. Es una planta monocotiledónea, que posee un tallo principal del cual surgen otros tallos divididos por nodos, presentan hojas alargadas y delgadas, la cantidad depende del tiempo de vida, florecen entre los 28 y 45 d dependiendo del ecotipo. (Rivera-Contreras 2017).