



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

“Búsqueda y análisis molecular de ecotipos de *Brachypodium distachyon* tolerantes al estrés por inundación”

Tesis

Presenta:

Biol. Irma Karla Rivera Contreras

Para obtener el título de:

Maestra en Biotecnología

Director de tesis:

Dr. Julián Mario Peña Castro

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2017



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2017/082
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado MB

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 22 de Febrero de 2017

**C. IRMA KARLA RIVERA CONTRERAS**  
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 Maestra en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	Presidente
Dra. Estela Flores Gómez	UPIBI-IPN	Vocal
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	UNPA	Secretario
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	1er Suplente
Dr. Edgar García López	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

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



**DR. MARIO VALERA ZARAGOZA**  
Jefe de la División de Estudios  
de Posgrado



**M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA**  
Vice-rector Académico,  
Vo. Bo.

**VICE-RECTORIA  
ACADEMICA**

C.c.p. Dr. Julián Mario Peña Castro – Director de tesis.  
C.c.p. L. P. 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/2017/174
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis MB

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 18 de Abril de 2017

**L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la C. Irma Karla Rivera Contreras, matrícula 13140015, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Búsqueda y análisis molecular de ecotipos de *Brachypodium distachyon* tolerantes al estrés por inundación**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chi ji ju



**Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. Irma Karla Rivera Contreras  
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

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Julián Mario Peña Castro y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - Secretaría de Educación Pública de México a través del proyecto para Jóvenes Investigadores Ciencia Básica (152642).**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A CONACYT** por la beca nacional de maestría 296916 y la beca para el fortalecimiento de mujeres indígenas (2014).

**Dra. Blanca E. Barrera Figueroa** por su apoyo y conocimientos aportados a lo largo de este proyecto y mi posgrado, un ejemplo a seguir como mujer e investigadora.

**Dra. Piyada Juntawong de la Universidad Kasetsart de Tailandia** por su invaluable colaboración en la realización del análisis transcriptómico.

**Dra. Ariana A. Huerta Heredia** por su tiempo y conocimientos aportados para realizar la determinación de estrés oxidativo *in situ* y como revisora del este trabajo.

**Dra. Estela Flores Gómez del Instituto Politécnico Nacional** por participar en los exámenes tutoriales y revisar la tesis.

**Dra. Jacqueline Capataz Tafur** por su apreciable colaboración con reactivos y equipo a lo largo de este trabajo, además de su tiempo y conocimientos aportados en la revisión de este trabajo.

**Dr. Julián M. Peña Castro** por la confianza, conocimiento, apoyo y tiempo que invirtió en mi; un excelente investigador y persona a la que admiro de tantas maneras que es un honor ser su estudiante.

**Dr. Ricargo Grande** del Instituto de Biotecnología de la UNAM por asesorar y realizar la secuenciación por RNA-Seq.

**Prof. David Garvin** del United States Department of Agriculture por la donación de las semillas de *Brachypodium distachyon* utilizadas en este trabajo.

**Dr. José Abad, Dra. Sandra del Moral, Ing. Juan Hernández** por compartir equipo y reactivos durante la elaboración de este trabajo.

**IBT. Teresa Zamora Hernández** por su amistad, paciencia y colaboración durante la elaboración de este trabajo.

## DEDICATORIAS

**Irma Contreras** una mujer admirable cuyo esfuerzo, apoyo incondicional y ejemplo me ha llevado a la persona que soy. Gracias por no soltarme nunca de la mano, te amo mamita.

**Samuel Sebastian** mi compañero de aventuras, gracias por estar a mi lado en una etapa más, por tus desvelos, amor y apoyo. Vamos por más, te amo.

**Rodrigo Isaí Sebastian Rivera** mi motivación para lograr este objetivo, espero algún día ser un buen ejemplo para ti y la mamá que te mereces. Te adoro mi niño hermoso.

**Ino, Alfredo, José y su familia** excelente personas que me han dado su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, espero poder corresponder de la misma forma algún día. Los quiero mucho. Tíos **Juanita y Pepe** mis ángeles guardianes, los amo y un día volveremos a estar juntos.

**Rafaela Rodriguez** gracias, por su motivación para que pudiera llegar a esta meta.

**Alba, Mera, Edwin y Alejandro** por cuidar de mi más grande tesoro con amor y apoyarme a lo largo de este camino. Nunca podré agradecerles todo lo que han hecho por mi familia. Tía **Bety** gracias por su cariño y apoyo en los mejores y peores momentos. Tía **Elia Rodriguez** gracias por su apoyo para conseguir material y su motivación para que concluyera este trabajo. **Enrique Cruz** gracias por tu apoyo y cariño durante estos años, te quiero mucho.

**Carmin, Kary y Claudia Santos** gracias por compartir juntas este camino, fue un privilegio aprender de ustedes y son una mis mejores recompensas de este viaje. **A todos mis compañeros de maestría y Xóchil, Paco, Mariana, Amado**, gracias por su amistad y todos los momentos que pasamos, aprendiendo, riendo y apoyandonos, espero tengan muchos éxitos en su vida.

**Amigos, Jose Antonio y Claudia Ortiz**, su amistad es una de las más grandes bendiciones que he tenido, gracias por estar siempre ahí. Los quiero mucho.

## Fragmentos de esta tesis fueron presentados en:

### Congresos:

- **Irma Karla Rivera-Contreras**, Teresa Zamora-Hernández, Ariana Arlene Huerta-Heredia, Jacqueline Capataz-Tafur, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Piyada Juntawong, Julián Mario Peña-Castro, 2015. The transcriptomic study of *Brachypodium distachyon* ecotypes with contrasting survival under submergence stress reveals oxidative stress as a major tolerance factor. XVI National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology and IX Plant Symposium México-USA. Oral. Querétaro, Querétaro, México.
- Teresa Zamora-Hernández, **Irma Karla Rivera-Contreras**, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Piyada Juntawong, Julián Mario Peña-Castro, 2015. A phylogenetic and transcriptional study of the ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR family active under submergence stress in *Brachypodium distachyon*. XVI National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology and IX Plant Symposium México-USA. Poster, Querétaro, Querétaro, México.
- **Irma Karla Rivera-Contreras**, Teresa Zamora-Hernández, Jacqueline Capataz-Tafur, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Piyada Juntawong, Julián Mario Peña-Castro, 2015. Transcriptomic analysis of *Brachypodium distachyon* ecotypes with contrasting tolerance to submergence stress. 1er Simposium Nacional de Genómica Estructural, Comparativa y Funcional. Cuernavaca, Morelos, México.
- **Irma Karla Rivera-Contreras**, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Julián Mario Peña-Castro, 2014. Búsqueda de ecotipos de *Brachypodium distachyon* con tolerancia contrastante al estrés por inundación. IV Encuentro de Biotecnología en la Cuenca del Papaloapan. Tuxtepec, Oaxaca, México.

### Publicación:

- **Rivera-Contreras IK**, Zamora-Hernández T, Huerta-Heredia AA, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM, 2016. Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. Scientific Reports 6:27686. Factor de Impacto JCR: 5.228; Indización: JCR, Scopus.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Los fenómenos de inundación y la agricultura en México. ....	2
1.2 Fisiología de las plantas en respuesta al estrés por inundación.....	5
1.3 Respuesta hormonal de las plantas al estrés por hipoxia. ....	7
1.4 La respuesta bioquímica de las plantas ante el estrés por inundación.....	9
1.5 Aplicación de biotecnología vegetal en estudios para el mejoramiento de la respuesta de las plantas ante el estrés por inundación. ....	13
1.6 <i>Brachypodium distachyon</i> : especie modelo para el estudio de gramíneas. ....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPOTESIS .....	20
4. OBJETIVOS .....	20
4.1 Objetivo general. ....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5. METODOLOGÍA.....	21
5.1 Material vegetal y su siembra. ....	21
5.2 Ensayos de inundación.....	22
5.3 Datos fisiológicos.....	23
5.4 Colecta de muestras para secuenciación. ....	23
5.5 Extracción de RNA para secuenciación. ....	24
5.6 Verificación de integridad y cuantificación de RNA .....	24
5.7 Digestión con DNasa. ....	25
5.8 Purificación por columnas de las muestras para secuenciación.....	25
5.9 Secuenciación RNA-seq en HiSeq Illumina. ....	26
5.10 Colecta para qPCR.....	27
5.11 Diseño de Primers. ....	27
5.12 Extracción de DNA genómico. ....	28
5.13 Comprobación de primers en PCR .....	29
5.14 Síntesis de cDNA.....	30
5.15 qPCR para cálculo de eficiencia de primers.....	31
5.16 Análisis bioinformático y ensamble transcriptómico. ....	31
5.17 Detección <i>in situ</i> de peróxido y superóxido. ....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33

6.1	Determinación de ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> con tolerancia contrastante al estrés por inundación. ....	33
6.2	Calidad de las muestras secuenciadas por RNA-Seq. ....	40
6.3	Análisis transcriptómico por RNA-Seq. ....	40
6.4	Determinación de estrés oxidativo <i>in situ</i> . ....	44
6.5	Oligonucleótidos para análisis de expresión en qPCR. ....	46
6.6	Selección de los tiempos de colecta, extracción y control de calidad de RNA para el análisis de expresión en qPCR. ....	48
6.7	Análisis cuantitativo en qPCR para determinar la expresión de los genes diferenciales. ....	51
7.	Modelo de tolerancia al estrés por inundación. ....	55
7.1	Manejo de estrés oxidativo y procesos de óxido reducción. ....	55
7.2	Grupos de fosforilación en respuesta a patógenos. ....	58
7.3	Transporte de iones metálicos. ....	59
7.4	Mecanismos regulados normalmente durante el estrés por inundación. ....	62
7.4.1	Los aminoácidos como reserva para la recuperación. ....	63
7.4.2	Regulación de mecanismos comunes de manejo de piruvato. ....	64
7.4.3	Traducción de proteínas y metabolismo de lípidos. ....	66
7.4.4	Integración del ciclo de ácidos tricarbóxicos y el ciclo del glioxilato. ....	68
7.4.5	Las rutas de floración durante el estrés por inundación. ....	69
8.	CONCLUSIONES. ....	75
9.	PERSPECTIVAS. ....	76
10.	REFERENCIAS. ....	77
11.	ANEXOS. ....	88

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategias de supervivencia vegetal durante la inundación. ....	7
Figura 2. Ruta de fermentación alcohólica como respuesta común de las plantas en estrés por hipoxia. ....	10
Figura 3. Los ERFs del grupo VII SUB1A y SNORKEL1/2 son reguladores de las estrategias de supervivencia a nivel transcriptómico. ....	13
Figura 4. Morfología general de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	18
Figura 5. Cambios fisiológicos observados en plantas de <i>Brachypodium distachyon</i> sometidas a estrés por inundación. ....	35
Figura 6. Plantas de los cuatro ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> sometidos a estrés por inundación. ....	36
Figura 7. Porcentaje de hojas sanas por ecotipo de <i>Brachypodium distachyon</i> después de seis días de recuperación posteriores al estrés por inundación. ....	37
Figura 8. Tiempo letal 50 de los cuatro ecotipos <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	38
Figura 9. Supervivencia de <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	39
Figura 10. Integridad del RNA de plantas de <i>Brachypodium distachyon</i> bajo estrés por inundación de 48 h. ....	41
Figura 11. Archivo FASTA de las secuencias de RNA-seq. ....	42
Figura 12. Diagrama de Venn de transcritos regulados exclusiva y comúnmente en los ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> Bd21 y Bd2-3 en 48 h de estrés por inundación. ....	42
Figura 13. Detección de superóxido y peróxido de hidrogeno en <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	47
Figura 14. Comprobación de amplificación por los oligonucleótidos diseñados en gDNA de <i>Brachypodium distachyon</i> Bd21. ....	49
Figura 15. Verificación de integridad de las muestras de RNA de <i>Brachypodium distachyon</i> para qPCR. ....	50
Figura 16. Verificación de ausencia de gDNA en extracciones de RNA de <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	50
Figura 17. Verificación de cDNA de ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> durante estrés por inundación. ....	51
Figura 18. Análisis cuantitativo en qPCR durante las primeras 12 horas de estrés por inundación de cinco genes seleccionados de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	54

Figura 19. Integración de las rutas del manejo de estrés oxidativo en <i>Brachypodium distachyon</i> . .....	60
Figura 20. Transcritos movilizados en la categoría de fosforilación en <i>Brachypodium distachyon</i> bajo estrés por inundación. ....	61
Figura 21. Transcritos del grupo de metales, regulados negativamente en <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	62
<i>Figura 22. Transcritos del grupo de procesos metabólicos de ácidos carboxílicos regulados positivamente en Brachypodium distachyon ecotipo Bd21 en estrés por inundación. ....</i>	<i>65</i>
Figura 23. Transcritos de los grupos de traducción de proteínas (A) fotosíntesis (B) y metabolismo de lípidos (C) regulados en <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	67
Figura 24. Transcritos expresados en la glucólisis y fermentación en ambos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	70
Figura 25. Transcritos expresados en el ciclo de Krebs y GABA en ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> en estrés por inundación. ....	71
Figura 26. Tiempo a floración de <i>Brachypodium distachyon</i> , ecotipos Bd2-3 y Bd21 después de un estrés por inundación. ....	73
Figura 27. Transcritos encargados del proceso de floración en <i>Brachypodium distachyon</i> , ecotipos Bd21 y Bd2-3. ....	74

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de huracanes por categoría (NHC, 2013). ....	2
Tabla 2. Cultivos y estados más afectados por la temporada de huracanes 2013 .....	4
Tabla 3. Características fisiológicas de los cuatro ecotipos seleccionados de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	21
Tabla 4. Mezcla de reacción para digestión con DNasa. ....	25
Tabla 5. Programación de los tiempos de colecta de plantas de <i>Brachypodium distachyon</i> para análisis de qPCR. ....	27
Tabla 6. Buffer de extracción para DNA genómico de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	28
Tabla 7. Mezcla de reacción PCR para comprobación de primers de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	29
Tabla 8. Programa de PCR para comprobación de primers de los genes seleccionados de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	29

Tabla 9. Mezcla de reacción para síntesis de cDNA de <i>Brachypodium distachyon</i> .....	30
Tabla 10. Mezcla de reacción para el cálculo de eficiencia de primers de <i>Brachypodium distachyon</i> en qPCR. ....	31
Tabla 11. Programa de qPCR y curva de disociación de primers de <i>Brachypodium distachyon</i> . ....	32
Tabla 12. Análisis de ontología de genes de ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> sometidos a estrés por inundación por 48 h.....	44
Tabla 13. Oligonucleótidos de <i>Brachypodium distachyon</i> diseñados para cuantificar su expresión en qPCR.....	49
Tabla 14. Expresión en valor Log2FC de los genes de <i>Brachypodium distachyon</i> seleccionados para el análisis en qPCR. ....	52

## RESUMEN

La agricultura es uno de los sectores más afectados por los desastres naturales. En México, la actividad de huracanes que provoca lluvias intensas e inundaciones es la segunda causa de pérdidas en cultivos. Durante estos eventos, las plantas se cubren total o parcialmente de agua, lo que provoca la obstrucción de la luz, cambios en la química del suelo, y disminución en la difusión de oxígeno. Las plantas responden bioquímicamente al estrés por inundación mediante el manejo de las reservas de carbohidratos; cuando estas se agotan, la muerte es inevitable.

Así, resulta imperante encontrar alternativas funcionales y factibles para mejorar la tolerancia de las plantas ante el estrés por inundación. En este aspecto, se han realizado estudios en arroz (*Oryza sativa*), donde se localizaron dos mecanismos de respuesta contrastante, el escape y la quiescencia, que están mediados por factores de transcripción de la familia *ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS*. Sin embargo, deben existir otros mecanismos en plantas silvestres que pudieran ser extrapolados a más especies.

En este trabajo, se utilizaron 4 ecotipos de la planta modelo monocotiledónea *Brachypodium distachyon*, Bd21, Bd1-11, Bd2-3 y Tek10, para determinar mediante experimentos fisiológicos y transcriptómicos si existe una tolerancia contrastante a la inundación.

Se determinó que los ecotipos con tolerancia contrastante fueron Bd21 (sensible) y Bd2-3 (tolerante), con una dosis letal 50 de  $2.6 \pm 0.1$  d y  $3.4 \pm 0.1$  d, respectivamente. El análisis de ontología génica a partir de los datos revelados por secuenciación del transcriptoma, demostró que el manejo diferencial del estrés oxidativo mediante la oxidasa alternativa, la nitrato reductasa y la hemoglobina, puede ser la base genética que confiere tolerancia al ecotipo Bd2-3.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Los fenómenos de inundación y la agricultura en México.

México se encuentra geográficamente dentro de dos áreas de actividad ciclónica, los océanos Atlántico y Pacífico (Manson y Jardel, 2009). Las inundaciones se originan mayoritariamente de los ciclones tropicales que son sistemas de tormentas con circulación cerrada que ocurren en el sentido contrario a las manecillas del reloj. Se forman por los vientos en la zona circundante que fluyen y aumentan la condensación de aire caliente y húmedo que libera vapor de agua, clasificándose de acuerdo a la intensidad de sus vientos en: perturbación tropical (vientos en superficie ligeros), depresión tropical (vientos en superficie de 61km/h), tormenta tropical (62 a 87 km/h) y huracán (Tabla 1; CONAGUA, 2014). La temporada de huracanes comienza, del 1 de junio hasta el 30 de noviembre, generalmente (NHC, 2013).

**Tabla 1. Clasificación de huracanes por categoría (CONAGUA, 2014).**

<b>Categoría</b>	<b>Velocidad de los vientos</b>
Categoría 1	118 a 153 km/h
Categoría 2	154 a 177 km/h
Categoría 3	178 a 209 km/h
Categoría 4	210 a 249 km/h
Categoría 5	250 km/h

Los huracanes tienen un impacto positivo en la generación de la temporada de lluvias, pero también negativo en las inundaciones (NHC, 2013). El sector socioeconómico de la agricultura es el que resulta más vulnerable a las inundaciones pues el segundo desastre natural que produce afectaciones después de la sequía (Agroasemex, 2011).

Los principales daños se dan en pérdidas de la estabilidad y producción de los cultivos (Agroasemex, 2011; Bailey-Serres *et al.*, 2012). Algunos ejemplos de lo anterior se describen a continuación. En octubre del 2005, el huracán Wilma ocasionó afectaciones al turismo, la agricultura, y las actividades económicas en general; se estima que en la agricultura se perdieron 4.6 millones de dólares (CNDH, 2011). El huracán Stan fue el décimo primer huracán de la temporada de huracanes de 2005 en el Atlántico y el sexto ciclón que impactó a México en dicho año. A pesar de que brevemente alcanzó la categoría de huracán, causó daños en el sector agropecuario estimados en 19 millones de dólares en más de 240,000 ha (Gutiérrez *et al.*, 2006).

En 2013, los huracanes Ingrid y Manuel afectaron un total de 612 000 ha sembradas con productos agroalimentarios en 19 estados, de las cuales 310,000 resultaron con pérdidas totales, siendo los estados con más daños en ha: Guerrero 215 mil, Tamaulipas 76 mil, Michoacán 38 mil, Sinaloa 35 mil, Veracruz 34 mil, Zacatecas 34 mil y Oaxaca 23 mil (2000agro, 2013). La temporada de huracanes 2013 fue la que más pérdidas de cultivos ocasionó en México, reportando severos daños a cinco estados y con pérdidas en miles de ha (Tabla 2)

Durante el huracán Odile en 2014 se necesitaron \$90.4 millones de pesos para proteger 20 mil 595 ha y 64 mil 919 unidades animal en los cinco municipios de Baja California Sur. Dentro de los cultivos protegidos se encuentran: cártamo, garbanzo, higo, maíz, mango, naranja, sorgo y trigo, así como ganado bovino, caprino y ovino (Pérez, 2014). La tormenta tropical Vance ocasionó fuertes lluvias en diversos estados, siendo Nayarit el más afectado con mil 680 ha de cultivo, de las cuales 800 son de tomatillo de hoja, 100 de sandía, 500 de jitomate, 200 de chile y 800 de jícama (Navarro, 2014).

**Tabla 2. Cultivos y estados más afectados por la temporada de huracanes 2013**

(Figuerola et al., 2013; Bello, 2013).

<b>Cultivo</b>	<b>Ha afectadas en el país</b>	<b>Estados más afectados</b>	<b>Ha afectadas en el estado en relación al total</b>
<b>Maíz</b>	213,000	Guerrero	103,000
<b>Sorgo</b>	102,000	Tamaulipas	
<b>Maíz</b>	11,900	Chiapas	11,274
<b>Varios</b>	8,925	Jalisco	8,925
<b>Sorgo, maíz, cultivos perennes, cítricos, otros.</b>	23,000	Oaxaca	23,000
<b>Caña, maíz, sorgo, cultivos perennes, cítricos, otros.</b>	50,784	Veracruz	50,784

Ante la situación de pérdidas, los campesinos han desarrollado estrategias para optimizar sus cultivos, por ejemplo, adaptando su siembra de acuerdo a las condiciones climáticas, edafológicas y sembrando sólo aquellos productos que se desarrollen plenamente en los sitios que habitan aunque no sean los más redituables. Otra de sus estrategias es el uso de la agrobiodiversidad y la aplicación empírica de la diversidad genética local, o la colecta de especies silvestres. Sin embargo, esto es sólo una solución temporal al problema pues las pérdidas económicas siguen siendo elevadas (Altieri y Nicholls, 2009).

Dado lo anterior, se concluye que los fenómenos de inundación ya sea que se presenten de forma gradual o súbita, producen pérdidas económicas severas a la población que depende de las actividades agrícolas para su supervivencia (Altieri y Nicholls, 2009).

De esta manera, es apremiante encontrar estrategias que mejoren la tolerancia a la inundación en las plantas de importancia económica.

## 1.2 Fisiología de las plantas en respuesta al estrés por inundación.

Los fenómenos de inundación se clasifican en dos tipos: parciales o totales. Los primeros cubren sólo las raíces (anegamiento) y los segundos, además de las raíces, también la parte aérea (sumersión). Ambos afectan directa o indirectamente la fisiología de las plantas, teniendo efectos muy graves en la ecología y la agricultura (van Veen *et al.*, 2014).

Durante estos eventos, la fase gaseosa de suelo cambia por una líquida, se acumulan gases y sustancias tóxicas como el metano, ácidos orgánicos, dióxido de carbono, sulfuros y etileno que afectan a los tejidos vasculares (xilema y floema) y al transporte de nutrientes (van Veen *et al.*, 2014). La disponibilidad de oxígeno se ve altamente comprometida, debido principalmente a que la difusión se realiza aproximadamente 10,000 veces más lento en el agua que en el aire, lo que produce estrés por hipoxia (niveles de oxígeno por debajo del 21% v/v de la normoxia; Lee *et al.*, 2011).

Las plantas tienen de estrategias para responder ante este evento, por ejemplo, algunas plantas de hábitat acuático (aunque no de forma exclusiva) desarrollan un tejido especializado llamado aerénquima, que funciona mediante la formación de espacios con aire en el tallo, auxiliando al transporte de oxígeno hacia los tejidos (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Estudios en la planta modelo *Brachypodium distachyon*, determinaron que la tolerancia al estrés por hipoxia no depende únicamente del desarrollo del aerénquima, sino del conjunto de la endodermis y sustancias como la suberina, que modifica la permeabilidad de la membrana y colocándose en modo de banda; esto recibe el nombre de "banda casparia" y mantiene al fluido en el centro de la raíz por la endodermis. La banda casparia también recibe el nombre de exodermis (Valla, 2007; Shiono y Yamada, 2014; van Veen *et al.*, 2014). También es común el desarrollo de raíces en partes del tallo, las cuales reciben el nombre de raíces adventicias (Voesenek y Bailey-Serres, 2015)

Sin embargo, las especies que no logran el desarrollo de la banda casparia ni de raíces adventicias, carecerán de una ruta suficiente para el transporte de oxígeno

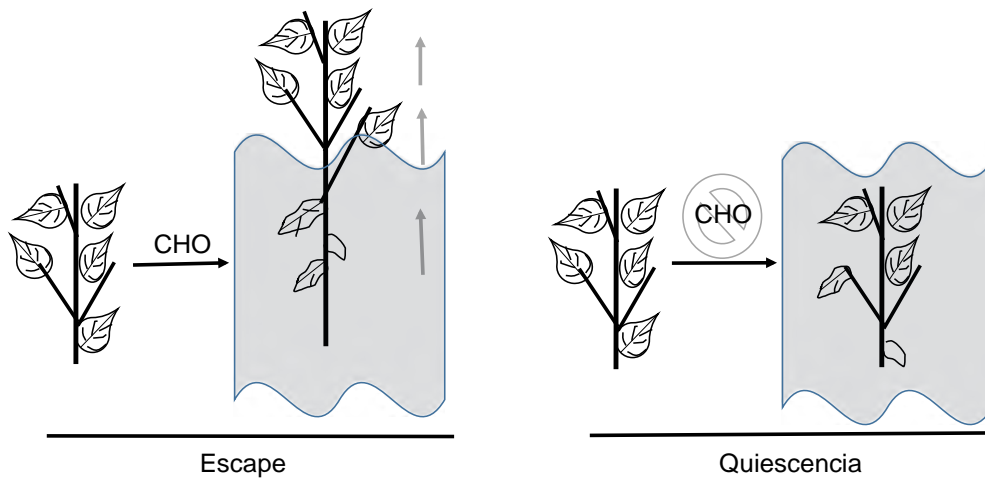
lo que explica la sensibilidad al estrés por inundación a pesar del desarrollo del aerénquima (Shiono y Yamada, 2014).

Las especies que de forma natural se adaptaron al anegamiento, y que son características de ambientes acuáticos, se encuentran dotadas del aerénquima para proveer de oxígeno a la planta y de largas superficies foliares que permiten el transporte de sustancias y gases para la fotosíntesis. Sin embargo, estas plantas no son tolerantes ante un evento de inundación total y prolongado (van Veen *et al.*, 2014).

Otras condiciones negativas de la inundación son el desequilibrio de nutrientes y de la actividad microbiana. El parénquima de reserva, que se denomina de acuerdo a las sustancias que acumula en sus células como tejido amilífero (almidón), sacarífero (sacarosa), inulífero (inulina) u oleífero (sustancias grasas), se encuentra en vacuolas, plastídios o paredes celulares y sufre alteraciones como almacenamiento deficiente de estas sustancias y nutrientes fundamentales en el desarrollo vegetal (Curtis y Barnes, 2007). Finalmente, la obstrucción de la captación de luz impide al tejido especializado en la fotosíntesis, denominado parénquima clorofílico (clorénquima), llevar a cabo su función, resultando en pérdidas energéticas y cambios morfológicos importantes como amarillamiento, necrosis, reducción de crecimiento e incluso la muerte (Bailey-Serres y Voeselek, 2010). Si la planta llega a sobrevivir, durante la recuperación, el daño celular se repara por el tejido de relleno que cubre los espacios intracelulares que dejan las células dañadas; sin embargo esto requiere de un gasto energético (Curtis y Barnes, 2007).

No todas las plantas logran desarrollar estos tejidos y para sobrevivir en ambientes inundados por temporadas, deben desarrollar otros mecanismos con mayor énfasis en el aspecto bioquímico. Ya que las plantas producen su alimento por fotosíntesis de carbohidratos generados a partir de dióxido de carbono, las reservas disponibles de estas moléculas resultan fundamentales ante un fenómeno de inundación. Las plantas responden mediante dos estrategias fisiológicas de supervivencia que se han descrito en especies domesticadas y silvestres de *Oryza sativa*, *Rumex* y *Arabidopsis* (Figura 1). La primera estrategia es el escape, donde se invierte la mayor parte de las reservas de carbohidratos en la elongación (crecimiento

fuera de lo normal) para sobresalir de forma parcial o total de la inmersión, sin embargo, esta estrategia no es exitosa si las reservas de carbohidratos se agotan antes de salir. La segunda es la quiescencia, donde el gasto de energía se minimiza mediante la inhibición de la floración, de la elongación y del consumo de carbohidratos, y sólo se utiliza en los procesos fundamentales para la supervivencia de la planta (Peña-Castro *et al.*, 2011; Bailey-Serres *et al.*, 2012; van Veen *et al.*, 2013; Fukao y Xiong, 2013).



**Figura 1. Estrategias de supervivencia vegetal durante la inundación.**

En el escape, se acelera el consumo de carbohidratos para elongar la parte aérea y poder realizar los procesos fotosintéticos. En la quiescencia: el consumo de carbohidratos se limita solo a las actividades fisiológicas necesarias para sobrevivir durante la inundación. Sin importar la estrategia utilizada, al finalizar el estrés, las plantas entran en un periodo de recuperación, donde se determina su supervivencia. CHO: carbohidratos.

### 1.3 Respuesta hormonal de las plantas al estrés por hipoxia.

Las hormonas vegetales son sustancias producidas por las células que regulan los procesos fisiológicos en las plantas y pueden actuar en el tejido donde se produjeron o a distancia al transportarse por los tejidos conductores (Taiz y Zeiger, 2006). Generalmente, cualquier evento de respuesta, se regula por la intervención de varias hormonas que pueden interactuar entre ellas y que funcionan como reguladores de la transcripción. Las hormonas principales durante y después de un proceso de inundación son el etileno, el ácido giberélico y el ácido abscísico (Kline *et al.*, 2010).

El etileno es una hormona vegetal gaseosa que se acumula durante la inundación y estimula o suprime el crecimiento de la planta de diferentes formas de acuerdo a la especie. En general, produce respuestas en las plantas ante estímulos ambientales bióticos y abióticos, lo que le confiere alta relevancia en las estrategias de supervivencia al estrés. Cuando la planta se encuentra en su ambiente natural, el etileno se produce y se libera como una señal de larga distancia. Sin embargo, ante una situación de estrés por inundación se acumula alrededor de los tejidos, iniciando una respuesta fisiológica rápida (Xu *et al.*, 2006).

Las plantas responden al etileno con alteraciones morfológicas y fisiológicas, como la extensión de brotes, desarrollo del aerénquima (por ejemplo, en *Zea mays*) e iniciación de raíces adventicias para anclaje al sustrato, suceso muy común en especies de arroz de aguas profundas (Hwan *et al.*, 2011). El etileno afecta diferentes etapas del ciclo de vida, como la germinación de la semilla, nodulación de raíces, abscisión, maduración y caída de los frutos, senescencia, floración, y en condiciones anaeróbicas provoca epinastia (cambio de ángulo en tallos y brotes; Wang *et al.*, 2002). En la inundación, las estrategias de escape y quiescencia se encuentran reguladas por el etileno (Bailey-Serres y Voeselek, 2008).

El ácido giberélico (GA) es una fitohormona soluble que actúa en la respuesta al estrés por inundación. Algunas de sus funciones son estimular el crecimiento de los tallos, inducir las divisiones mitóticas en las hojas, e incrementar la tasa de germinación. Durante un evento de estrés por inundación, la acción del GA se amortigua por el etileno, con el resultado de regular la elongación, germinación, floración, cantidad de semillas producidas, y finalmente el consumo de carbohidratos (Kline *et al.*, 2010; Fukao y Bailey-Serres, 2008). La relación GA-etileno no siempre es competitiva pues depende de los factores genéticos de las plantas. En ocasiones su relación es cooperativa, como en el caso del escape (Hattori *et al.*, 2009)

Otra hormona importante durante el estrés por inundación es el ácido abscísico (ABA). Las funciones del ABA en la célula son controlar la síntesis de proteínas y el almacenamiento de lípidos en la semilla. Se transporta por los tejidos vasculares en plantas y cuando se encuentran en estrés por inundación o sequía, induce el cierre

estomático e inhibe la germinación y la maduración del embrión, y confiere tolerancia a la salinidad, además de estimular repuestas a heridas y patógenos (Hung *et al.*, 2004; Kline *et al.*, 2010). Durante el estrés por inundación inhibe la elongación de los tallos en la estrategia de quiescencia (Fukao y Xiong, 2013).

Dependiendo de la estrategia de supervivencia, puede existir efectos antagónicos o sinérgicos entre las fitohormonas. Por ejemplo, en el arroz quiescente, mientras el gen SUB1A se induce por el etileno y a su vez, limita la producción del mismo así como la de GA (Fukao *et al.*, 2006). En el arroz que tiene los genes SK1/2, se inducen por el etileno pero estimulan la síntesis de GA (Hattori *et al.*, 2009) En el caso del ABA, su degradación permite una mejor respuesta de elongación, y al contrario, en la quiescencia, la estimulación de su síntesis detiene el crecimiento y aumenta la conservación de carbohidratos (Fukao *et al.*, 2011). De tal forma, la relación entre hormonas depende del genotipo vegetal en estudio, y el resultado varía incluso entre las mismas especies. Otro caso que se ha estudiado es el de *Rumex*, en donde la relación etileno-ABA depende también del tipo celular de estudio con una respuesta diferente en las hojas (sinérgica) y en los peciolos (antagónica; Voesenek y Bailey-Serres, 2015).

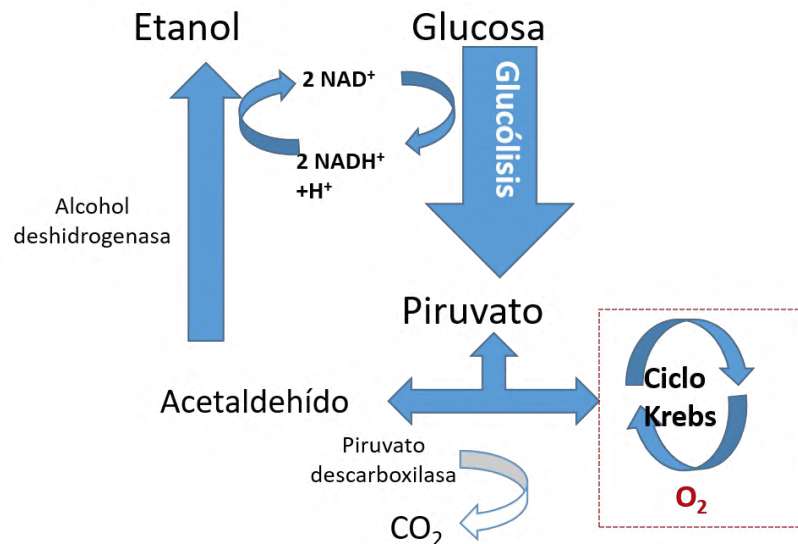
#### **1.4 La respuesta bioquímica de las plantas ante el estrés por inundación.**

La falta de oxígeno que se presenta durante el estrés por inundación provoca una insuficiencia de ATP y NADH pues se compromete la respiración mitocondrial donde el aceptor final de electrones es el oxígeno (Bailey-Serres *et al.*, 2012). Cuando se presenta una disminución (hipoxia) o ausencia de oxígeno (anoxia), las plantas deben recurrir a las rutas metabólicas de la respiración anaerobia y el catabolismo de la sacarosa, la glucólisis y la fermentación etanólica para garantizar la extracción de energía de los carbohidratos. Mientras las reservas de carbohidratos lo permitan, la célula vegetal podrá continuar obteniendo energía mediante los diferentes tipos de fermentación (Bailey-Serres *et al.*, 2013; Banti y Giuntoli, 2013).

Sin embargo, la fermentación tiene el costo de un bajo aprovechamiento de las reservas de carbohidratos y de poco rendimiento energético, no obstante es el único camino que le queda a la planta para sobrevivir (Lodish *et al.*, 2011; Perata y Voeselek, 2007).

Los ajustes para permitir la transición del metabolismo aerobio al anaerobio se inician desde la conversión de la sacarosa en glucosa y la degradación del almidón para que se pueda incorporar a la glucólisis. A partir de la glucosa, se produce NADH, ATP y piruvato. Las diferentes rutas anaeróbicas de aprovechamiento de piruvato se activan transcripcionalmente, para que la enzima piruvato descarboxilasa produzca acetaldehído, que se convierte en etanol por la alcohol deshidrogenasa que utiliza NADH como co-factor. El resultado final es que el NAD<sup>+</sup> se recicla para mantener a la glucólisis funcionado y el etanol se convierte en un producto de desecho (Figura 2; Bailey-Serres y Voeselek, 2008; Banti y Giuntoli, 2013).

El punto clave para la adaptación de las plantas a este proceso depende de las reservas de carbohidratos y de la regulación de su consumo en el contexto de las estrategias de supervivencia de escape y quiescencia (Bailey-Serres y Voeselek, 2008; Banti y Giuntoli, 2013) y factores de transcripción de diversas familias.



**Figura 2. Ruta de fermentación alcohólica como respuesta común de las plantas en estrés por hipoxia.**

El metabolismo anaerobio se activa, reciclando NAD<sup>+</sup> a partir de piruvato mediante la enzima alcohol deshidrogenasa. Esta adaptación dota de una ruta alternativa a los procesos del ciclo de Krebs, lo que permite la supervivencia de la planta hasta que las reservas de carbohidratos se agoten.

Estos transcritos están asociados con el metabolismo anaerobio y la regulación positiva de los genes sensibles a hipoxia de los cuales más de la mitad codifican proteínas llamadas *HYPOXIA UNKNOWN PROTEINS (HUP)* que no tienen una función conocida al momento pero que contribuyen a la supervivencia de las plántulas en anoxia (Mustroph y Bailey-Serres, 2010). Todas estas respuestas moleculares en conjunto promueven la tolerancia a la inundación de forma diferencial de acuerdo a la concentración de oxígeno y la disponibilidad de luz (Lee *et al.*, 2011).

Durante un evento de estrés por hipoxia, se observó que en *Arabidopsis* (una especie quiescente), la cantidad de transcritos se reduce en un 90%, lo que permite la conservación de la energía celular fundamental para sobrevivir. La regulación se da al reprimir los mensajeros que no son necesarios para sobrevivir al evento de inundación y reanudando su traducción sólo hasta la re-oxigenación (Sorenson y Bailey-Serres, 2013). Este aspecto no se ha investigado en especies que usen la estrategia de escape.

Cuando se produce una baja de oxígeno, se activan mecanismos de determinación de la cantidad de oxígeno disponible. Se observó que los factores de transcripción *ERFs* poseen en el extremo N-terminal (*MCGGAI*) de su secuencia proteica una señal de degradación dependiente de ubiquitina que se activa en presencia de oxígeno. En *Arabidopsis thaliana*, se comprobó que este extremo N-terminal (*MCGGAI*) funciona como un mecanismo de detección de oxígeno donde la secuencia de aminoácidos amino-terminal del ERF *RAP2.12* es la señal de degradación (Licausi *et al.*, 2010).

El arroz es una de las plantas monocotiledóneas de mayor importancia a nivel económico y nutrimental, y por ello se convirtió en el blanco de estudio en el estrés por inundación, pues su producción se afecta constantemente por eventos de estrés por inundación. A pesar de ser una planta adaptada a la inundación parcial, si el grado y duración de la inmersión aumenta en un tiempo considerable, resulta mortal (Septiningsih *et al.*, 2009; Fukao y Xiong, 2013).

En el arroz se encontró que las respuestas de escape y quiescencia se regulan a nivel molecular por los *ERFs* grupo VII. El escape y la quiescencia son respuestas

antitéticas durante la inmersión, donde los ERFs actúan en el último paso de la vía de señalización del etileno como factores de transcripción, por lo que se adhieren por un dominio de unión al ADN a la sección del promotor de los genes para iniciar la transcripción (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Fukao y Xiong, 2013).

En el arroz, los *ERFs* de las estrategias de escape son *SNORKEL1* y *SNORKEL2* (*SNK1* y *SNK2*) que actúan como promotores de la respuesta a *GA*, inducen el consumo de carbohidratos y la elongación. El ERF de la estrategia de quiescencia es el gen *SUB1A-1* que minimiza el consumo de carbohidratos, conserva la clorofila y detiene el crecimiento mediante el aumento de la sensibilidad al *ABA* (Figura 3; Fukao *et al.*, 2006; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Fukao y Xiong, 2013).

El gen *SUB1A-1* es también el regulador principal durante la recuperación post inundación cuando se da la re-oxigenación y se restaura la homeostasis (Fukao *et al.*, 2011; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Fukao y Xiong, 2013). En este proceso, las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas productos del metabolismo del oxígeno con un alto grado de toxicidad que funcionan como reguladores de los genes que aceleran el envejecimiento, la apoptosis y produce respuestas de defensa (Hansberg, 2002). Las ERO se producen en las plantas después de un proceso de inundación al exponerse nuevamente al contacto con el oxígeno y su destoxificación se controla positivamente por *SUB1A-1* (Fukao *et al.*, 2011).

A partir de los conocimientos sobre la tolerancia al estrés por inundación a nivel molecular en arroz, se han realizado estudios que demuestran en otras especies como *Arabidopsis*, *Rumex*, *Lotus*, *Poplar* y *Potamogeton* que los mecanismos de escape y quiescencia también están presentes (Bailey-Serres y Voesenek, 2010; Singh *et al.*, 2013). Sin embargo, los ERFs sólo explican al 69% de los fenotipos tolerantes a la inundación en arroz, por lo que deben existir otros genes reguladores que pudieran haberse perdido durante el proceso de domesticación de las plantas con importancia agroeconómica (Singh *et al.*, 2013).



situaciones de estrés. Con los avances en el estudio de la biología molecular se puede intentar responder esta pregunta (Chaudhary, 2013).

Las mismas características que le han conferido relevancia a las plantas de cultivo sobre las silvestres, les proporcionan un alto nivel de dificultad para su estudio, pues la mayoría tienen ciclos de vida relativamente largos, genomas complejos, son físicamente grandes, y difíciles de cultivar y cuidar (Opanowicz *et al.*, 2008). Es por ello que se ha optado por utilizar plantas modelo para realizar las primeras aproximaciones moleculares.

Estas especies modelo se eligen de acuerdo a la sintenia que comparten con la especie de interés, por tener ciclos de vida más cortos, ser prolíferas, tener genomas conocidos y herramientas moleculares disponibles (Vogel *et al.*, 2010)

En este aspecto, se ha logrado aplicar el conocimiento obtenido en plantas modelo a otras de la misma especie e incluso de interés agrícola. El principal ejemplo de esto es el gen *SUB1A*, un ERF-VII que funciona como regulador en la respuesta molecular al estrés por inundación y que ha permitido obtener variedades de arroz tolerantes a largos periodos de inundación en países asiáticos con métodos no transgénicos (Singh *et al.*, 2013). También mejora la respuesta a sequía mediante la regulación de las rutas dependientes de *ABA* y *GA*, como respuesta al déficit hídrico (Fukao *et al.*, 2011). En plantas de *Arabidopsis*, se describió otro papel importante de *SUB1A* cuya expresión en plantas transgénicas aumenta el rendimiento de sacarificación en un 300% en comparación con las especies silvestres (Núñez-López *et al.*, 2015). Este conocimiento se dirige hacia una alternativa en la producción de etanol y biocombustibles.

Existen otros mecanismos descritos en plantas modelo y estudiados en diferentes especies o variedades que podrían conducir a la tolerancia al estrés por inundación. La ruta N-terminal que funciona como reguladora de la respuesta a estrés por hipoxia, mediante la activación de los ERFs VII, y que se identificó en *Arabidopsis thaliana* (Licausi *et al.*, 2011), también se estudió en cebada (*Hordeum vulgare L.*), un cereal altamente susceptible a la inundación, y se observó que la regulación negativa

de la enzima *PROTEOLYSIS 6* de la ruta N-terminal estabiliza a los ERFs y mostrando una alta expresión de genes de respuesta a hipoxia (Mendiondo *et al.*, 2015)

Mediante el estudio del transcriptoma de plantas de maíz (*Zea mays*) se encontraron otros genes diferenciales en ecotipos con tolerancia contrastante. Se identificó el gen *FRUCTOSE-6-PHOSPHATE 1-PHOSPHOTRANSFERASE (PFP)*, *HEMOGLOBIN 2 (HB2)* y *RELATED TO VP1 (RAV1)*. *HB2* desencadena la respuesta a estrés oxidativo en estrés por inundación. *RAV1* es un gen de la familia de los ERFs cuya expresión en *Arabidopsis thaliana* conduce a la senescencia temprana (Campbell *et al.*, 2015).

En el arroz se han encontrado otros genes además de los ERFs que tienen un papel importante en la tolerancia a la inundación. Este es el caso del gen *THREALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE (T6P)* que al acumularse funciona como indicador de la baja disponibilidad de carbohidratos, favoreciendo la administración de las reservas de almidón principalmente en semillas germinantes (Kretschmar *et al.*, 2015)

Estos estudios son ejemplos donde el conocimiento obtenido en plantas puede ampliarse mediante el uso de especies modelo y emplearse en desarrollos biotecnológicos. En el caso del estrés por inundación, la planta modelo más utilizada ha sido *Arabidopsis*, sin embargo, a la fecha se han utilizado nuevas especies con tolerancias contrastantes y genomas secuenciados, por ejemplo, *Rumex* (van Veen *et al.*, 2013). Utilizando las herramientas moleculares para el estudio de transcriptoma y la variación natural de especies se han encontrado genes clave en la tolerancia al estrés por inundación. Sin embargo, aún resulta apremiante explorar mecanismos a nivel molecular, bioquímico o fenotípico que permitan encontrar mecanismos de tolerancia y asociarlos a la conservación de almidón, la germinación, floración, estructura de la raíz, entre otros (Singh *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014).

A partir del estudio del genoma de las especies modelo, podemos conocer las variantes génicas responsables de la diversidad dentro de las especies en común, lo que permitiría a futuro contar con técnicas de transformación genética para obtener organismos transgénicos para su estudio (Opanowicz *et al.*, 2008). Así, se puede tener

un acercamiento a la comprensión de las estrategias y los cambios a nivel molecular en los organismos en un momento y situación determinados y extrapolarse a otros.

### **1.6 *Brachypodium distachyon*: especie modelo para el estudio de gramíneas.**

Las gramíneas son plantas monocotiledóneas de la familia *Poaceae* con aproximadamente 820 géneros y 12,000 especies dentro de las que se encuentran algunas de las plantas económicamente más importantes como el maíz, sorgo, trigo, arroz, caña de azúcar y pastos para el forraje o para producir biocombustibles. Son importantes en la alimentación mundial directa (cereales y harinas) o indirectamente (forraje para ganado). Constan de 13 subfamilias, una de ellas es la *Pooidae*, a la cual pertenecen algunos cereales importantes como el trigo, la cebada, la avena y el heno (Bevan *et al.*, 2010).

*Brachypodium distachyon* es un pasto cuyo nombre deriva del griego *brachys* (corto) y *podion* (pie), en referencia a sus espiguillas subsésiles. Es una hierba anual, sus espiguillas contienen típicamente alrededor de 10 a 12 semillas, es auto-fértil, tiene un ciclo de vida de menos de 4 meses, y a pesar de su pequeña estatura (20 cm en la edad adulta) tiene grandes semillas, culmos, hojas no basales en forma de láminas lineales de 3-12 mm de ancho, sin venación en cruz, lígula membranosa truncada de 1-6 mm de largo, inflorescencia paniculada, raquis ahuecados pedicelados (Figura 4; Draper *et al.*, 2001; Watson y Dallwitz, 2008).

Su variación natural se encuentra limitada a Asia, África y Europa (Opanowicz *et al.*, 2008). Dada la diversidad de habitats característicos de estos continentes, existen alrededor de 57 ecotipos de esta especie, lo que a su vez le confiere adaptación y diversidad genética, y se podría encontrar un punto clave de la tolerancia a ciertas condiciones de estrés. Algunos de estos ecotipos son Bd21, Bd1-1, Bd2-3 y Tek10 y se han estudiado en condiciones de sequía (Luo *et al.*, 2011).

*Arabidopsis thaliana* ha sido el centro de atención de estudio en plantas modelo por décadas; sin embargo, al encontrarse filogenéticamente distante a la familia *Poaceae*, no puede utilizarse como modelo directo (Bevan *et al.*, 2010). *B. distachyon* posee las mismas características que hacen a *Arabidopsis* un excelente modelo de estudio como su tamaño pequeño, fácil reproducción (1000 plantas/m<sup>2</sup>) en cámara de crecimiento o invernadero, es autofertil y no se cruza con facilidad entre sí, variabilidad genética, genoma secuenciado y pequeño, transformación genética, y dispone de varias herramientas moleculares y bioinformáticas para su estudio (Opanowicz *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2010; IBI, 2010). Además que se encuentra evolutivamente entre el arroz y el trigo, pero con suficiente cercanía a otras plantas de grano con grandes genomas como maíz, cebada, centeno y avena. Esta cercanía evolutiva permite hacer comparaciones genómicas entre estas especies, dando a *B. distachyon* la importancia como una especie modelo, aunado a las múltiples herramientas moleculares disponibles para su estudio.

Dentro de estas herramientas, la primera y más importante, es su genoma completamente secuenciado con un tamaño de 270 Mb. Adicionalmente es fácil su transformación genética, hay mapa genético, métodos de cruzamiento eficientes, datos de expresión, colección de tDNA y germoplasmas, cromosomas BAC, condiciones de crecimiento definidas, protocolos de mutagénesis, secuencias TAG y bajo porcentaje de ADN repetitivo debido a su tamaño (Brutnell *et al.*, 2015)

Las características fisiológicas, morfológicas y moleculares de *Brachypodium distachyon* lo han convertido en una planta modelo importante durante los últimos años, que nos permite tener un mejor enfoque de estudio relativos a la evolución, tolerancia y/o función de la familia *Poideae* (Draper *et al.*, 2001; Brutnell *et al.*, 2015).

La respuesta al estrés por inundación no se ha explorado en esta especie modelo, por lo que se podrían encontrar genes de respuesta importantes que no se hayan descrito previamente.



**Figura 4. Morfología general de *Brachypodium distachyon*.**

Plantas del ecotipo Bd2-3 con 38 días de edad. Su fisiología es común de las plantas monocotiledóneas, posee un tallo principal del cual surgen otro tallos divididos por nodos, hojas alargadas y delgadas cuyo número depende de la etapa de vida, espigas e inflorescencias que aparecen entre los 28 y 45 días de edad, según el ecotipo.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la susceptibilidad de México a los desastres naturales asociados a tormentas tropicales por su localización geográfica, la inundación es el segundo desastre natural que causa más daños a los cultivos. Las pérdidas económicas agrícolas se traducen en ciclos productivos truncados, endeudamiento, dependencia de apoyos de emergencia y en muchos casos, en abandono de tierras y migración.

Las plantas agroeconómicamente importantes se han seleccionado fenotípicamente de acuerdo a las características útiles para la alimentación humana, lo que las ha llevado a la pérdida de características importantes que le confieren tolerancia a los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, incluido el estrés por inundación.

Dado lo anterior, las plantas monocotiledóneas no domesticadas como el pasto silvestre *Brachypodium distachyon*, pueden ser una fuente útil para encontrar nuevos genes o mecanismos relacionados con la respuesta a la tolerancia del estrés por inundación.

En este trabajo, se realiza una búsqueda de material genético de *Brachypodium* con tolerancia contrastante a la inundación, para analizarlo con un estudio transcriptómico que permita encontrar mecanismos moleculares integrados de relevancia fisiológica expresados en el material tolerante. La intención es que se pueda usar la información para expandir el conocimiento actual de la fisiología del estrés y que estos mecanismos permitan en el futuro, planear estrategias biotecnológicas para aumentar la capacidad de las plantas de cultivo monocotiledóneas de tolerar el estrés por inundación.

### **3. HIPOTESIS**

Las plantas de *Brachypodium distachyon* bajo estrés por inundación expresarán un transcriptoma que les permitirá regular la homeostasis energética.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general.**

Identificar los genes expresados durante el estrés por inundación en *Brachypodium distachyon*, una planta modelo monocotiledónea no domesticada.

#### **4.2 Objetivos específicos.**

1. Seleccionar ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21, Bd1-1, Bd2-3 y Tek10) con tolerancia contrastante después de ser sometidos a diferentes tiempos de estrés por inundación.
2. Determinar mediante secuenciación de mensajeros (RNA-Seq) y herramientas de bioinformática a los genes que se expresan diferencialmente en los ecotipos contrastantes.
3. Confirmar mediante qPCR la expresión de genes descubiertos por el análisis RNA-Seq.
4. Postular un modelo molecular que integre la respuesta ante el estrés por inundación de *B. distachyon*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Material vegetal y su siembra.

Las semillas de *B. distachyon* que se utilizaron pertenecen a la colección del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. Las semillas originales fueron donadas por el Departamento de Agricultura de EUA (USDA) a través del Prof. David Garvin.

Las características fisiológicas principales de los ecotipos sembrados se muestran en la Tabla 3. Se Seleccionaron por la tolerancia contrastante a sequía, pues en arroz, las variedades tolerantes a la inundación también lo son a la sequia (Fukao *et al.*, 2006)

**Tabla 3. Características fisiológicas de los cuatro ecotipos seleccionados de *Brachypodium distachyon*.**

(<sup>1, 2</sup>)Reportado en proporción Fv/Fm (Lou *et al.*, 2011), (<sup>3</sup>)Schwartz *et al*, 2010, (<sup>4</sup>)determinado en este estudio y reportado en Rivera- Contreras *et al.*, 2016.

Ecotipo	Actividad del fotosistema en sequía <sup>(1)</sup>	Contenido de agua en hojas en sequía <sup>(2)</sup>	Acumulación de biomasa en hojas <sup>(3)</sup>	Tiempo de floración <sup>(3)</sup>	Clase del genotipo <sup>(3)</sup>	Tolerancia a la inmersión <sup>(4)</sup>
Bd21	Moderada	Moderada	Baja	Temprana	1	Baja
Bd2-3	Baja	Baja	Baja	Media	3	Moderada
Bd1-1	Alta	Alta	Moderada	Tardía	2	Alta
Tek10	Alta	Alta	Alta	Tardía	-	Alta

Para desinfectar las semillas, se colocaron máximo 40 semillas en un tubo Falcon con 35 ml de cloro comercial y agua (1:4) en agitación por 5 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, para romper la dormancia de la semilla y sincronizar la germinación, se llenó el tubo con agua destilada estéril, todos los tubos se envolvieron en papel aluminio e incubaron a 4°C por 4 d.

La siembra se realizó en sustrato inerte Sunshine #3 (SunGro) que es una mezcla de turba vegetal, vermiculita y agente de humedecimiento. Se le agregó perlita en volúmenes 4:1. Se esterilizó a 121°C por 60 min, una vez a temperatura ambiente, se agregó 2% del peso (49.28 g x 16 litros) en fertilizante desbalanceado NPK 15-15-17 (Nitrofoska).

Para todos los ensayos, las macetas se rotularon (ecotipo, fecha de siembra, y días de estrés), se les colocaron piedras al fondo para dar mayor peso a la maceta y evitar su flotación y se llenaron con sustrato al tope. Las semillas se introdujeron con ayuda de unas pinzas dejando visible el asta, cinco por maceta. Las plantas crecieron en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan con las siguientes condiciones: 16 h luz / 8 h oscuridad, luz 180  $\mu$  E  $m^{-2} s^{-1}$ , 50% humedad, 23°C de temperatura ambiente, con un régimen de riego de cada dos días.

## **5.2 Ensayos de inundación.**

Cien semillas por ecotipo se dividieron en grupos de 5 semillas por maceta, que corresponden a un total de 4 macetas de cada tiempo de estrés a probar más su control. Un día antes del estrés, se colocó una cama de arena por encima del sustrato para evitar que flotara. El ensayo de inundación se realizó en el cuarto de crecimiento en las condiciones previamente descritas a los 14 d después de la germinación. El ensayo comenzó tres horas antes de la oscuridad.

En tinajas de 45 cm de alto llenas con agua de la llave filtrada por filtros Hydronet (Rotoplas), se sumergieron lentamente cada una de las macetas. Después del tiempo determinado de estrés (que se indica en las secciones correspondientes) se retiraron de la misma manera. Las macetas que se extrajeron del agua en cada tiempo de estrés, se ordenaron en charolas y crecieron lado a lado con sus controles.

Se realizaron 10 ensayos de inundación. Los primeros tres determinaron el tiempo de estrés donde se observaban cambios fisiológicos determinantes en un rango de 1-

9 d de estrés. Se realizaron seis ensayos adicionales para obtener datos estadísticos confiables; de ellos, tres entre 1-2.5 d de estrés y tres entre 1-4 d y uno para colecta de RNA-Seq.

### **5.3 Datos fisiológicos**

Se tomaron datos fisiológicos a partir del día de germinación, un día antes del ensayo de estrés (14 días de edad), al finalizar el ensayo, seis días y 12 días después, y hasta la floración. Estos tiempos se determinaron por las observaciones relevantes en los cambios fisiológicos de la planta. Los datos registrados fueron la altura (medida con regla), conteo manual de número de hojas totales, tallos, hojas afectadas, edad y fecha de floración. Se fotografiaron cada uno de los días en los que se tomaron datos.

Para los datos de floración sólo se obtuvieron de los ecotipos Bd21 y Bd2-3, ya que son similares en su ciclo de vida corto, contando desde el día de germinación hasta la aparición de la primera espiga de cada individuo.

Los datos se procesaron en Excel 2010, para graficar y obtener promedio, desviación, estándar, error estándar y prueba T de Student. Las pruebas ANOVA se realizaron en MiniTab. El mejor indicador de estrés fue la supervivencia vegetal y se utilizó para calcular el tiempo letal 50 en el servidor IC50 (<http://ic50.tk>) con los datos de viabilidad de tres experimentos independientes después de seis días de recuperación.

### **5.4 Colecta de muestras para secuenciación.**

Se realizó un ensayo de inundación total de 48h, y se colectó el tejido aéreo de 5 individuos de cada condición (control e inundación) pertenecientes a 3 muestras independientes de los ecotipos contrastantes Bd21 y Bd2-3. Las muestras se

envolvieron en papel aluminio, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **5.5 Extracción de RNA para secuenciación.**

Para la obtención de los 50 µg de RNA necesarios para la secuenciación, se realizó la extracción mediante el protocolo de Trizol (Invitrogen, 15596018). Las muestras para la secuenciación se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero y se depositaron en un tubo cónico de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de Trizol por cada 50-100 mg de tejido.

Después de 5 minutos a temperatura ambiente se agregó 0.3 ml de cloroformo por cada ml de Trizol, se sacudió vigorosamente por 15 segundos e incubó por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, se separó la fase acuosa formada a un nuevo tubo para el aislamiento de RNA, se adicionaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol, se agitó, y después de 10 min a temperatura ambiente se centrifugó por 10 min a 4°C para obtener la pastilla de RNA precipitado.

Para el lavado de la pastilla de RNA se removió el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 75% por cada ml de Trizol. Se agitó y centrifugó a 7500 rpm por 5 min a 4°C. El líquido se decantó y la pastilla se secó por 5 a 10 min a temperatura ambiente. Se resuspendió en agua libre de RNasas y se almacenó a -70°C.

### **5.6 Verificación de integridad y cuantificación de RNA**

La integridad del RNA se visualizó por electroforesis en gel de agarosa desnaturizante al 1% (formaldehído 18%) empleando MOPS 1X como buffer de corrida (Anexo 1). El gel se fotografió con el fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene). La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando como blanco agua libre de nucleasas. Para determinar si era

correcta la purificación se verificó que la relación de proteínas (260/280) y orgánicos (260/230), se usaron aquellas extracciones con una relación igual o mayor a 2.

### **5.7 Digestión con DNasa.**

Para la eliminación de DNA de la extracción del RNA total para la secuenciación se utilizó a la enzima DNase I (EN0521, Thermo Scientific,) en proporción 1µl/µl RNA. Para obtener 8µl de muestra total, se realizó el mix de la Tabla 4. De acuerdo a la concentración de RNA medida en el Nanodrop 2000 se ajustó el volumen necesario de agua DEPC para completar la reacción y luego se agregó el mix. Se incubó a 37°C por 30 minutos.

**Tabla 4. Mezcla de reacción para digestión con DNasa.**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
RNA	8 µl
Buffer	8 µl
DNasa	8 µl.
Agua	56 µl
Total muestra	80 µl

### **5.8 Purificación por columnas de las muestras para secuenciación.**

Para aumentar la pureza de las muestras se realizó una limpieza por columnas con el kit Direct-zol RNA miniPrep R2050S (Zymo Research, ZRC180114). Se pasó la muestra obtenida después de la digestión a una columna y se le agregó 300 µl RNA lysis Buffer, se centrifugó a 12,000 g por 60 s. Se transfirió el filtrado al tubo Zymo spin IIc, se centrifugó a 8,000 g por 30 s. Se agregaron 320 µl de etanol al filtrado en el tubo de colecta y se mezcló por pipeteo. Se transfirió a la columna Zymo spin IIc con

el tubo de colecta, se centrifugó a 12,000 g por 30 s, se descartó el líquido del tubo colector y se colocó nuevamente la columna, se centrifugó a 12,000 g por 1 min y se repitió. Se agregaron 800 µl de RNA wash buffer, y se centrifugó a 12,000 g por 30 s, se decantó y repitió 2 veces más (en la última repetición se agregaron solo 400 µl), y se dejó secar. La columna se transfirió a un tubo de 1 ml, con el nombre de la muestra, y se agregaron 25 µl de agua libre de RNAsas a la membrana y se esperó 1 min, se centrifugó 10,000 g por 30 s, y se realizó nuevamente elución con el mismo filtrado para concentrar la muestra.

El purificado se midió en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se observó en electroforesis de gel de agarosa al 1% (Anexo 2) para asegurar la calidad de las muestras. Se normalizaron las muestras a 50 µl de RNA total para tener una concentración final de 50 µg/ 100µl. se almacenaron a -80°C y se transportaron al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en un tanque de nitrógeno líquido para su secuenciación.

### **5.9 Secuenciación RNA-seq en HiSeq Illumina.**

Se llevó a cabo como un servicio en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) a cargo del Dr. Ricardo Grande. Se analizó la integridad del RNA con un aparato de micro electroforesis Bioanalyzer 2100 (Agilent). Se construyeron 12 librerías de cDNA y se secuenciaron en una máquina HiSeq2500 (Illumina) en formato 1x50 de 2 líneas. Las 12 librerías fueron triplicados de los dos ecotipos contrastantes (Bb21 y Bd2-3) y las dos condiciones probadas (controles paralelos y 48 h de estrés).

Los datos crudos y su análisis se encuentran en el NCBI en la sección Gene Expression Omnibus con el número GEO GSE74222.

## 5.10 Colecta para qPCR.

Se realizó un ensayo de inundación total, independiente al de la secuenciación para coleccionar muestras durante las primeras 24 h de inundación. Se inició la colecta 3 horas antes de la noche de las plantas y la última a las 24 h de inundación, de acuerdo al horario del cuarto de crecimiento y continuando de acuerdo a la programación de la Tabla 5. En total se obtuvieron 8 colectas, en cada una se cortó el tejido aéreo de 5 individuos de 3 muestras independientes de cada ecotipo Bd21 y Bd2-3 (control e inundación), la cuales se colocaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Finalmente las muestras colectadas se pulverizaron en nitrógeno líquido para la extracción inmediata de RNA de acuerdo a lo especificado en la sección 5.5.

**Tabla 5. Programación de los tiempos de colecta de plantas de *Brachypodium distachyon* para análisis de qPCR.**

Las horas inundadas corresponden al tiempo que han pasado las plantas en estrés, donde 0 corresponde al control, los recuadros amarillo y gris indican el tiempo de luz/ oscuridad de las plantas en el cuarto de crecimiento con respecto al horario de colecta, las X indican que no hubo colecta en esa hora.

	Día			Noche									Día				
Hora de colecta	20:00	21:00	22:00	23:00	0:00	1:00	2:00	3:00	4:00	5:00	6:00	7:00	8:00	12:00	16:00	20:00	
Horas inundadas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	
No. De colecta	1	X	2	x	3	x	x	x	4	x	x	x	5	6	7	8	

## 5.11 Diseño de Primers.

De los genes seleccionados del análisis transcriptómico y el de ontología de acuerdo de acuerdo a su expresión diferencial y pertenencia a los grupos (detalles en Sección 6.5), a partir de sus secuencias en versión CDS (sin exones) que se descargaron en la página [www.phytozome.jgi.doe.gov](http://www.phytozome.jgi.doe.gov), se realizó el diseño de oligonucleótidos en la página [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) en la sección "real time qPCR". En cada secuencia se identificaron los sitios de amplificación de las secuencias de

oligonucleótidos (Anexo 3) para comprobar que mantuvieran dos características estándar importantes: amplificar la región cercana al extremo 3'UTR y temperatura de alineamiento alrededor de los 62°C. Adicionalmente, los oligonucleótidos del gen *Bradi4g31040* que se diseñaron flanqueando su intrón (Zamora, 2016), se usaron para poder observar productos específicos de cDNA (150 pb) o de contaminación por gDNA (250 pb). La síntesis de los oligonucleótidos se realizó como un servicio en el laboratorio MacroGen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Korea)

### 5.12 Extracción de DNA genómico.

Se pulverizó en nitrógeno líquido una hoja de las muestras control y se agregaron 500 µl de Buffer de extracción (Tabla 6), se mezcló por vortex y, se incubó a 65°C por 30 min. Se agregaron 500 µl de fenol cloroformo (24:1) y se agitó en vortex 30 s, se centrifugó 10 min a 14,000 g, y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de isopropanol y se mezcló. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 g por 15 min. Se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Posteriormente, se agregaron 750 µl etanol al 70% y centrifugó por 7 min a máxima velocidad, se secó por 10 min, y se agregaron 100 µl de EB (Qiagen elution buffer) y se almacenó a -20°C.

**Tabla 6. Buffer de extracción para DNA genómico de *Brachypodium distachyon*.**

Componente	Cantidad
0.5 M EDTA pH 8	1 ml
2.5 M NaCl	2 ml
1M Tris pH 8	0.5 ml
10% SDS	0.4 ml
Agua desionizada	6.1 ml
Vol. total	10 ml

### 5.13 Comprobación de primers en PCR

Los primers se disolvieron con ddH<sub>2</sub>O (Anexo 1) en concentración de 100pmol/μl. Para observar los tamaños esperados de los productos se realizó una prueba de PCR con gDNA y la enzima Dream Taq Green PCR Master Mix (K1081, Thermo Scientific). Se realizó una mezcla de reacción PCR como en la Tabla 7, y se agregó 1μl de gDNA 1:10.

Se usó el termociclador Techne (TC-512) con el programa de la Tabla 8. Finalmente se observaron las muestras en un gel de agarosa al 2% (Anexo 2).

**Tabla 7. Mezcla de reacción PCR para comprobación de primers de *Brachypodium distachyon*.**

Componente	Cantidad
ddH <sub>2</sub> O	5 μl
Dream Taq Green Master Mix	10 μl
Primer F	2 μl
Primer R	2 μl
gDNA 1:50	1 μl
Vol. total	20 μl

**Tabla 8. Programa de PCR para comprobación de primers de los genes seleccionados de *Brachypodium distachyon*.**

	Temperatura	Tiempo	
Activación de polimerasa y desnaturalización inicial	95°C	10 min	
Desnaturalización	95°C	15 s	40 ciclos
Alineamiento	56°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Elongación final	72°C	30 s	
Curva Melting	60°C a 95°C		

## 5.14 Síntesis de cDNA

A las muestras de *B. distachyon* de la sección 5.12 se les extrajo RNA como se describe en la sección 5.5. Se observó el RNA en gel de agarosa desnaturalizante (Anexo 2) para verificar su integridad.

Para comprobar la ausencia de gDNA, se utilizó la enzima DNA polimerasa convencional DreamTaq Green PCR master mix (K1081, Thermo Scientific) y se usó como templado una dilución 1:20 de la solución 0.5 µg de RNA en 9.5 µl ddH<sub>2</sub>O. Como control positivo se usaron 2µl gDNA 1:50 de Bd21. Una vez que se aseguró la ausencia de gDNA mediante la confirmación de que no se obtenía una banda de amplificación, se realizó síntesis de cDNA con el kit Maxima first strand cDNA synthesis (K1642, Thermo Scientific) como se muestra en la Tabla 9. Se agregaron 2.15 µg de RNA, y se adicionó el volumen necesario de ddH<sub>2</sub>O para obtener 14µl. Las muestras se incubaron en el termociclador (TC-512, Techne) a 25°C por 10 min, 50°C por 30 min y 85°C por 5 min.

Finalmente las muestras se prepararon para su uso en diluciones 1:10 de cDNA sintetizado (6 µl cDNA + 54 µl ddH<sub>2</sub>O).

**Tabla 9. Mezcla de reacción para síntesis de cDNA de *Brachypodium distachyon*.**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
5X reacción Mix	4 µl
Maxima enzyme Mix	2 µl
RNA	2.15 µg
ddH <sub>2</sub> O	c.b.p.
Vol. Total	20 µl

### 5.15 qPCR para cálculo de eficiencia de primers.

Se utilizó cDNA de Bd21 con dos días de estrés por inundación en concentración de 5,000 ng. A partir del cDNA sintetizado de las muestras de RNA de la sección 5.14 se realizaron las siguientes diluciones 1:4, 1:16, 1:64 y 1:256.

Se utilizó la enzima Máxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) que se agregó en el mix de la Tabla 10.

**Tabla 10. Mezcla de reacción para el cálculo de eficiencia de primers de *Brachypodium distachyon* en qPCR.**

Mix Máxima SYBR Green	(1X)
Agua libre de nucleasas	5 µl
Máxima SYBR mix	10 µl
Primer Forward 1:10	2 µl
Primer Reverse 1:10	2 µl
cDNA de cada dilución	1 µl

Los primers de los genes seleccionados (Tabla 13) se utilizaron en dilución 1:10. La mezcla se agitó por inversión suave 30 veces y se cargaron duplicados de 20 µl para cada primer en la placa de qPCR. Se usó un Termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific,) con el programa de la Tabla 11 y se usó el software precargado Piko Real v. 2.2 para observar la curva de disociación y calcular la eficiencia.

### 5.16 Análisis bioinformático y ensamble transcriptómico.

Las secuencias que se obtuvieron por illumina, se analizaron en colaboración con la Dra. Piyada Juntawong de la Kasetsart University en Bangkok, Tailandia.

**Tabla 11. Programa de qPCR y curva de disociación de primers de *Brachypodium distachyon*.**

	Temperatura	Tiempo	
Activación de polimerasa y desnaturalización inicial	95°C	10 min	
Desnaturalización	95°C	15 s	40 ciclos
Alineamiento	56°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Elongación final	72°C	30 s	
Curva Melting	60°C a 95°C		

Se empleó el software Illumina Casava 1.7 para extraer las bases, y para realizar el corte de las secuencias de adaptador se utilizó Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014).

Las secuencias limpias se mapearon en el genoma de *Brachypodium distachyon* v.2.1 del ecotipo Bd21 (Bdistachyon\_283\_v2.0; descargado de <http://genome.jgi.doe.gov>) con TopHat2 con los parámetros -p 4 --library-type fr-firststrand (Anders *et al.*, 2016). El alineamiento de las lecturas a las regiones genómicas se cuantificó con HTseq (Anders *et al.*, 2016). El análisis de los genes expresados diferencialmente se realizó con el software edgeR con GLM (modelo lineal generalizado) y una tasa de falsos descubrimientos < 0,05 (FDR). Se construyeron tablas con cuentas por millón (CPM) para todos los modelos de genes y los resultados para el análisis de la expresión diferencial.

Para el análisis Ontología de Genes (GO), se utilizó un el filtro de selección de acuerdo a la regulación en el CPM de  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$  regulados positivamente,  $\leq -1.5$  regulados hacia abajo y un valor de FDR <  $0.05 \times 10^{-5}$ . Una vez agrupados los datos se ingresaron en la página Phytozome 10.3 ([phytozome.jgi.doe.gov](http://phytozome.jgi.doe.gov).) Con la herramienta PhytoMine para obtener un listado de ontología, valor P 0.05 y agrupados únicamente en procesos biológicos.

Los datos analizados se encuentran almacenados en el disco compacto anexo a esta tesis.

### **5.17 Detección *in situ* de peróxido y superóxido.**

Se realizó un ensayo de inundación con duración de 24 h, se colectaron las hojas de 5 individuos de 3 experimentos individuales de cada ecotipo. Para su tinción, se utilizó el protocolo descrito por Fukao *et al.* (2011). Inmediatamente, se sumergieron en tubos que contenían 25 ml del buffer de detección correspondiente.

Para detectar superóxido, se agregó 50 mg/100 ml de azul de nitrotetrazolio (NBT; N6876, Sigma-Aldrich) en un buffer de fosfatos 10 mM pH 7.6. Para detectar peróxido, se disolvieron 103 mg/100 ml de 3,3'diaminobencidina (DAB; D12384, Sigma-Aldrich) en un buffer de TRIS acetato 50 mM, pH 5.0. Los tubos se colocaron en agitación por 4 horas envueltos en aluminio. Al finalizar, se retiró el buffer y se agregaron 40 ml de etanol (95%), se pusieron los tubos en baño de agua hirviendo durante 30 minutos para retirar la clorofila. Se desechó el etanol y se rehidrataron las hojas con 30 ml de glicerol (40%) durante 16 horas. Finalmente, se fotografiaron los tejidos en un transiluminador de luz blanca y un estereoscopio para determinar cualitativamente la coloración de la tinción en las hojas. La preparación de reactivos se encuentra en el anexo 4.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Determinación de ecotipos de *Brachypodium distachyon* con tolerancia contrastante al estrés por inundación.**

Con base en el conocimiento de que la tolerancia a la sequía está regulada por un mecanismo cercano a la tolerancia a la inundación en arroz (Fukao *et al.*, 2011), se seleccionaron cuatro ecotipos de *B. distachyon* con tolerancia contrastante a la sequía,

Bd1-1 y TeK-10 como tolerantes, Bd21 y Bd2-3 como sensibles (Luo *et al.*, 2011). Estos ecotipos también tienen variación en su ciclo de vida por el tiempo de floración (Tabla 3; Hong *et al.*, 2010).

Para determinar el tiempo de duración del estrés, se realizó un ensayo de inundación con los tiempos útiles conocidos para determinar la tolerancia en *Arabidopsis thaliana* que son de 3, 5, 7 y 9 d (Peña-Castro *et al.*, 2011).

Los principales cambios fisiológicos que se observaron en *Brachypodium* se manifestaron en las hojas, por ejemplo pérdida de turgidez, clorosis y necrosis (Figura 5). Sin embargo, aún cuando se conservaron partes sanas que mostraban la posibilidad de supervivencia, al tomar datos fisiológicos se observó la muerte de las plantas, después de 5 d de estrés más 6 días de recuperación. De tal forma, se determinó que si las plantas no presentan a los 6 días después de la inmersión signos de recuperación, la planta se considerará muerta.

En este ensayo, únicamente se pudieron obtener observaciones fisiológicas de los individuos sumergidos por 3 días, mientras que para los 5, 7 y 9 d, el estrés fue muy intenso y ninguna planta sobrevivió pasado el lapso de recuperación. Así, el siguiente ensayo se recortó a una duración de 1, 2, 3 y 4 d. Sin embargo tampoco proporcionaron una definición entre el tiempo de estrés, por lo que se recortó finalmente a 1, 1.5 y 2, 2.5 d de estrés.

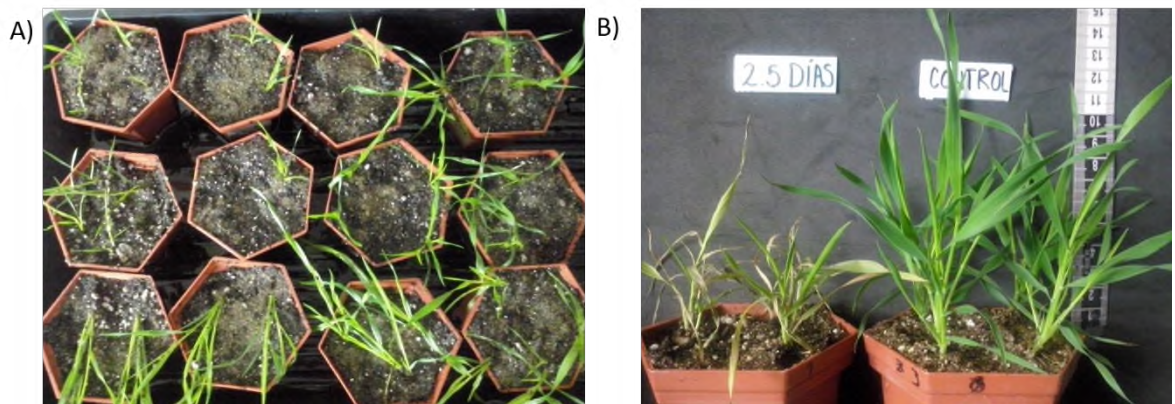
Con estos tiempos, se realizaron 3 experimentos independientes y se tomaron datos fisiológicos de altura, hojas afectadas, viabilidad, y sólo para Bd21 y Bd2-3 también de tiempo a floración debido a su floración temprana.

Los cuatro ecotipos de *Brachypodium* que se estudiaron expresaron una respuesta quiescente pues el tallo no se elongó en respuesta a la inundación (Figura 6).

Se observó que en el primer día de estrés no se producen afectaciones severas, aún después de los 6 d de recuperación. Sin embargo en los individuos con 2.5 d de estrés del ecotipo Bd21, las hojas no mostraron recuperación y la mayoría presentó

clorosis o necrosis. El ecotipo Bd1-1 no recuperó el crecimiento foliar en comparación con su control, y únicamente Bd2-3 y Tek10 se recuperaron del estrés (Figura 6).

Para cuantificar diferencias entre los ecotipos, se tomaron datos fisiológicos por experimento y por día de estrés. En los datos de altura no se obtuvieron diferencias significativas, por lo que se descartó como parámetro de selección (Anexo 5). Cuando se analizaron las hojas sanas por individuo y días de estrés se observaron diferencias significativas entre los ecotipos (Figura 7).



**Figura 5. Cambios fisiológicos observados en plantas de *Brachypodium distachyon* sometidas a estrés por inundación.**

A) Plantas con hojas encamadas al finalizar el estrés por inundación. B) Plantas de Bd21 de 2.5 d de estrés y control, las primeras con hojas con pérdida de turgencia y clorosis.

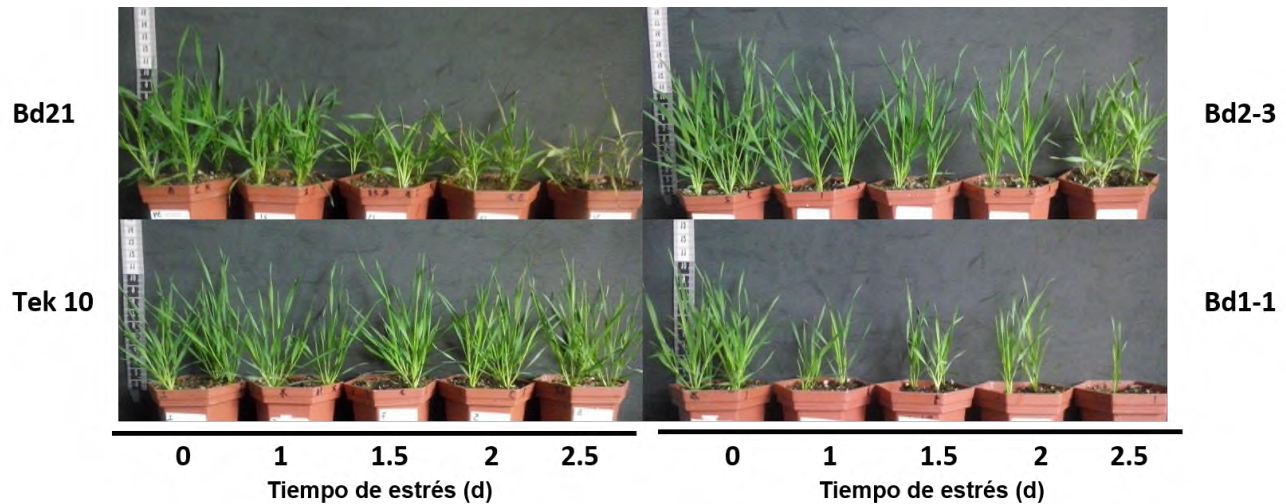
El ecotipo Bd21 es el que conservó el menor porcentaje de hojas sanas después del estrés para continuar con las actividades fisiológicas necesarias para su supervivencia.

Los ecotipos Bd2-3, Bd1-1 y Tek10 resultaron con menor afectación en las hojas, conservando de 70-90% de sus hojas en condiciones favorables, sin marchitamiento, clorosis, ni necrosis visible. Estos resultados concuerdan con los datos reportados para sequía donde Bd1-1 y Tek10 fueron los más tolerantes (Luo *et al.*, 2011).

Para determinar la supervivencia de los ecotipos, se tomaron datos del porcentaje de la diferencia entre individuos sobrevivientes con respecto al inicio del

estrés de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 7 y 9 días de estrés y después de 6 días de recuperación. Estos resultados muestran que el ecotipo que tiene menos porcentaje de supervivencia es Bd21 (Figura 8).

A partir del segundo día de estrés, el porcentaje de individuos vivos se encuentra por debajo del 50%.



**Figura 6. Plantas de los cuatro ecotipos de *Brachypodium distachyon* sometidos a estrés por inundación.**

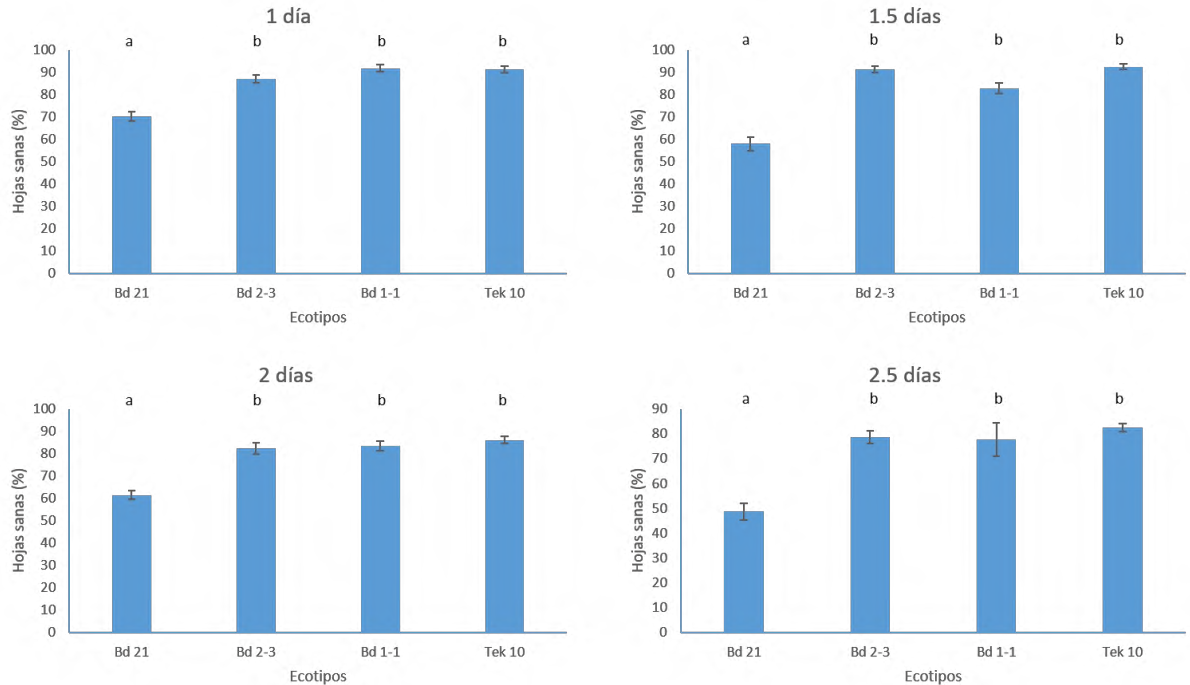
Plantas con 23 días de edad y fotografiados 6 días después de haberse sometido a la inmersión por el tiempo indicado.

Para cuantificar el índice de supervivencia y así poder determinar un ecotipo tolerante se calculó el tiempo letal 50 ( $LT_{50}$ ) que indica el tiempo en que el 50% de los individuos de cada ecotipo ha muerto mediante el servidor ic50.tk. El  $LT_{50}$  para los ecotipos fue de  $2.6 \pm 0.1$ ,  $3.4 \pm 0.1$ ,  $4.7 \pm 0.1$ ,  $4.9 \pm 0.1$  para los ecotipos Bd21, Bd2-3, Bd1-1 y Tek10, respectivamente (Figura 8)

La observación del porcentaje de hojas sanas y el valor de  $LT_{50}$  demuestran que el ecotipo Bd21 es el más sensible ante el estrés por inundación mientras que los ecotipos Bd2-3, Bd1-1 y Tek10 son más tolerantes.

Para seleccionar al ecotipo tolerante que se usaría en los experimentos moleculares, se tomaron en cuenta las características fisiológicas diferenciales en

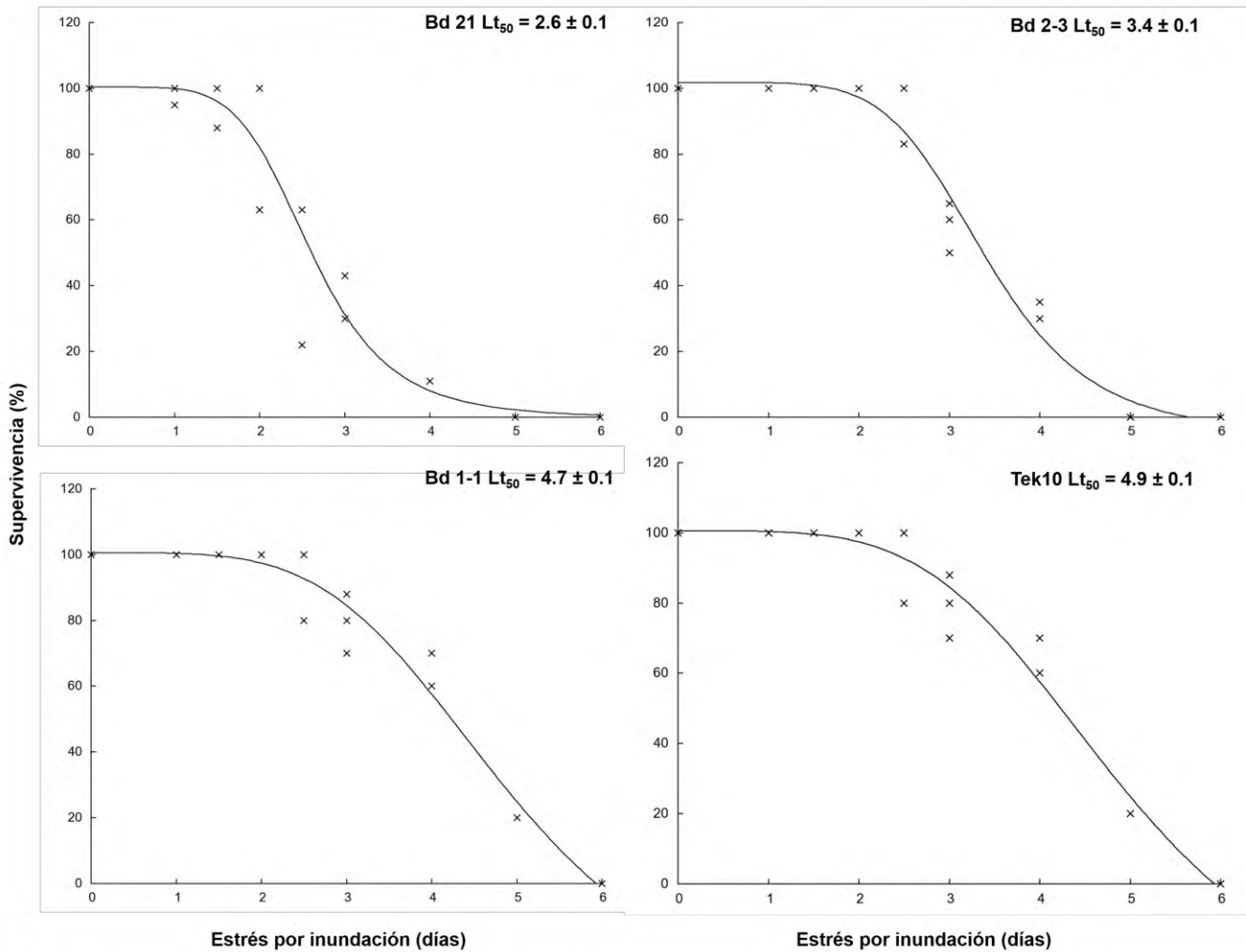
comparación con el ecotipo sensible (Tabla 3). La principal diferencia entre ellos es el tiempo a floración, Bd1-1 y Tek10 son de tiempo largos (60 d), mientras que Bd2-3 y Bd21 son de tiempo corto.



**Figura 7. Porcentaje de hojas sanas por ecotipo de *Brachypodium distachyon* después de seis días de recuperación posteriores al estrés por inundación.**

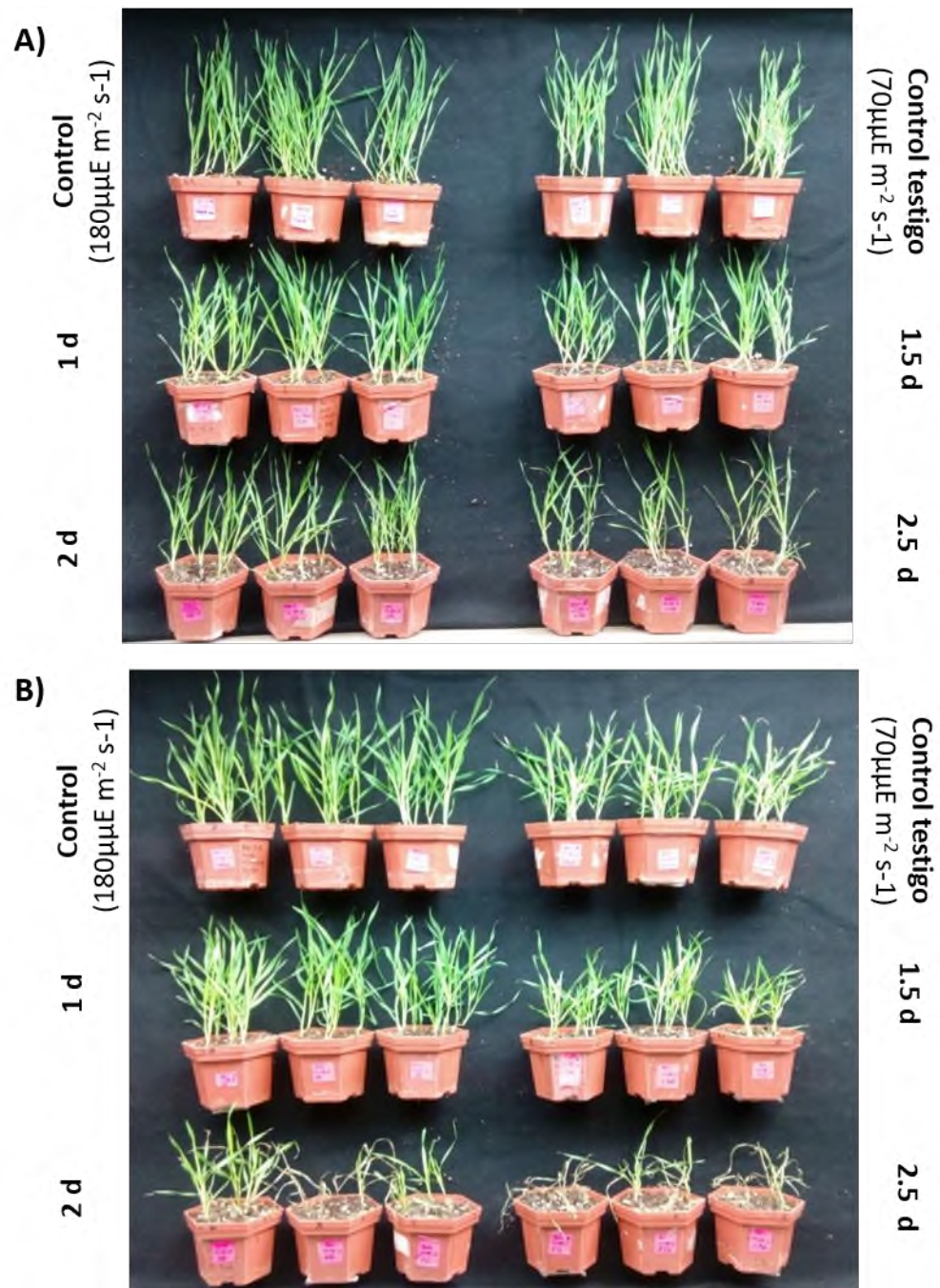
Corresponde a los datos de 3 experimentos independientes. Los días corresponden a la duración del estrés. Datos promedio de 3 experimentos independientes,  $\pm$  E. E. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre ecotipos, prueba t de Student  $p < 0.01$ .

Debido a que los procesos de floración se ven afectados a nivel molecular en plantas en estrés por inundación (Peña-Castro *et al.*, 2011), se pensó que al comparar ecotipos de distinto hábito en el análisis transcriptómico, las variaciones a nivel molecular no se podrían discutir si son debido al estrés por inundación o a la fisiología del ecotipo. Ya que Bd2-3 es similar en tiempo de floración a Bd21, se decidió considerarlo como el ecotipo tolerante para este estudio. En soporte de la decisión anterior, las diferencias fisiológicas después de seis días de recuperación del estrés por inundación entre Bd21 y Bd2-3 son diferenciales, tanto cuantitativamente (Figura 8) como visualmente (Figura 9).



**Figura 8.** Tiempo letal 50 de los cuatro ecotipos *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.

Los datos de supervivencia se colectaron a los seis días de recuperación. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes (n=15 plantas).



**Figura 9. Supervivencia de *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.**

Ecotipos A) Bd2-3 y B) Bd21 con 20 días de edad, después de seis días de recuperación.

## **6.2 Calidad de las muestras secuenciadas por RNA-Seq.**

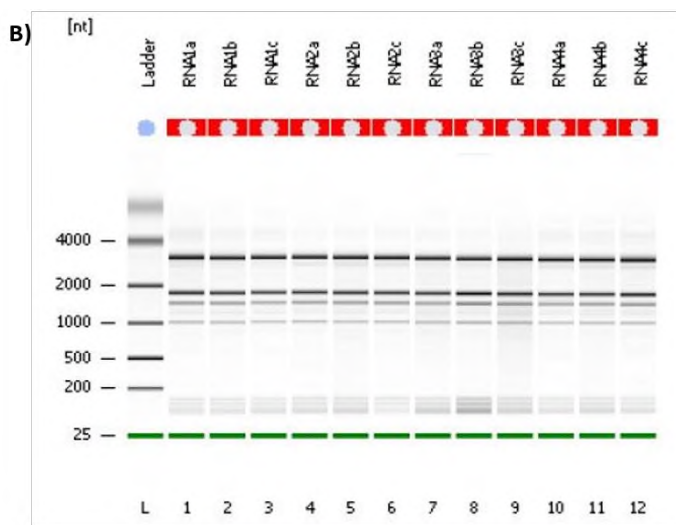
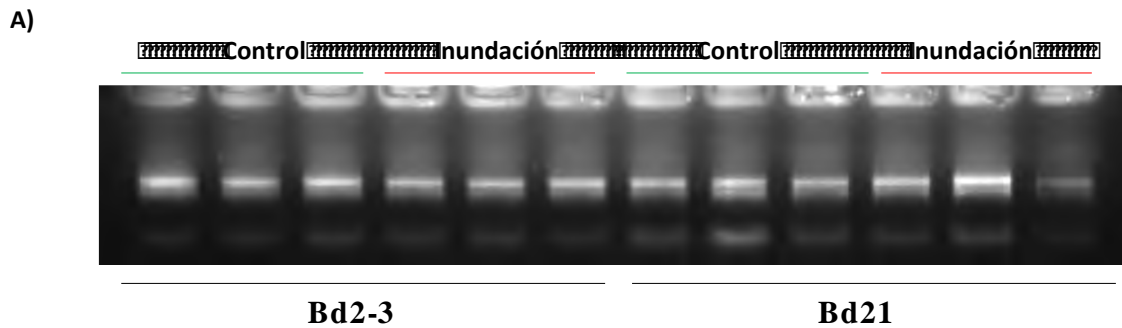
Para determinar la pureza e integridad de las muestras de RNA que se utilizaron en la secuenciación, se observaron en gel de agarosa las dos bandas características del rRNA bien definidas y sin signos de barrido (Figura 10A), lo que determinó visualmente la integridad del RNA. También los resultados en Bioanalyzer mostraron los picos de integridad de las dos partes del rRNA 28s y 18s (Figura 10B) y los valores de integridad RIN se encontraron entre 6.4-7.2 (Figura 10D; Anexo 6). Las doce muestras analizadas que corresponden a los triplicados enviados de las dos condiciones y ecotipos tuvieron las características similares (Figura 10C).

La secuenciación de las librerías de RNA-seq fue en formato 1X50. Se entregó en formato FASTA con los siguientes datos por secuencia encontrada: equipo de secuenciación, versión y coordenadas de secuenciación, seguido de 50 nucleótidos encontrados entre los adaptadores de secuenciación, un signo positivo (+) que es un lugar asignado para agregar descripciones adicionales o secuencias extras, un código de letras que determina la calidad de la unión de cada base asignado en el programa Phred 3 (Figura 11).

## **6.3 Análisis transcriptómico por RNA-Seq.**

Para 20,743 genes de la versión genómica 2.1, se obtuvieron los parámetros de cuentas por millón (CPM) y  $\text{Log}_2\text{FC}$  ( $\text{FDR} < 0.05 \times 10^{-5}$ ) que indican respectivamente la abundancia del número de transcritos de cada gen en una condición y el número de veces que se dobló la expresión.

Lo anterior para las 6 condiciones resultantes de las combinaciones de ecotipo y estrés. Cuando se agruparon los transcritos de acuerdo al filtro de selección descrito en la sección 5.16, 317 genes se regularon positivamente en ambos ecotipos, 466 fueron exclusivos de Bd2-3 y 706 de Bd21. Aquellos regulados hacia abajo en común fueron 330, y exclusivamente son 851 en Bd2-3, y 1026 en Bd21 (Figura 12).



C)

Etiqueta de la muestra	Ecotipo/condición	Réplica
1 a	Bd 2-3 control	1
1 b	Bd 2-3 control	2
1 c	Bd 2-3 control	3
2 a	Bd 2-3 inundación	1
2 b	Bd 2-3 inundación	2
2 c	Bd 2-3 inundación	3
3 a	Bd 21 control	1
3 b	Bd 21 control	2
3 c	Bd 21 control	3
4 a	Bd 21 inundación	1
4 b	Bd 21 inundación	2
4 c	Bd 21 inundación	3

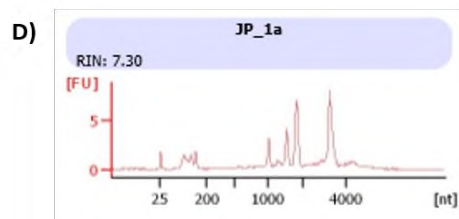


Figura 10. Integridad del RNA de plantas de *Brachypodium distachyon* bajo estrés por inundación de 48 h.

A) Gel de agarosa 1% muestra de RNA de los dos ecotipos en condiciones control y 2 días de inundación. B) Visualización en Bioanalyzer de las 12 muestras de la extracción de RNA para la secuenciación. C) Códigos de indentificación en librerías. D) Gráfica de Bioanalyzer de la muestra 1a (Bd2-3 control) donde se observan el RIN y dos picos principales que corresponden a los rRNAs 18s y 28s.

```

1.                                     2.
@MG00HS16:556:H0066BCXX:1:1101:1363:2155 1:N:0:TGACCA
GCTTGAGGTTGCTCAGTTTCCCGAGAATCGACCCAGAAATTCCATGTTGC } 3.
+
DDDB@HIIIECGHHIHHHGIIIIIIIIIIHIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIHIIIIH
4.

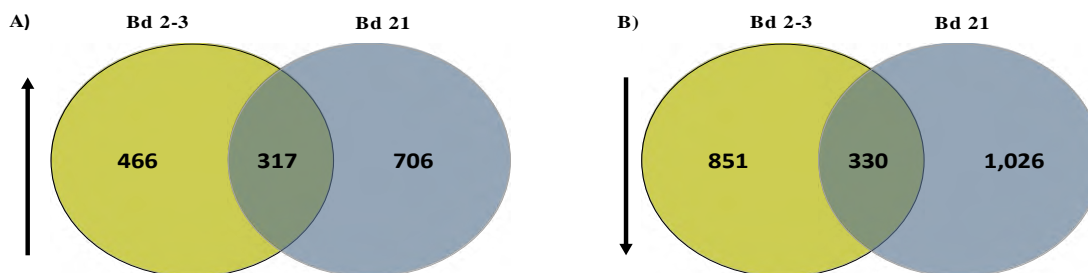
```

**Figura 11. Archivo FASTA de las secuencias de RNA-seq.**

1. Datos, versión y coordenadas del equipo de secuenciación. 2. Índice de diferenciación de librerías 3. Secuencia de 50 nucleótidos encontrada dentro de los adaptadores. 4. Letras asignadas por la calidad de unión entre bases, asignadas por el programa Phred 3,

A estos genes que se expresaron diferencialmente, se les realizó un análisis de ontología de genes (GO).

El análisis de GO se fragmentó agrupando los genes en categorías de acuerdo a su expresión, regulados hacia arriba (up), regulados hacia abajo (down), y presentes constantemente (cons). De esta clasificación, resultaron 8 combinaciones diferentes contrastando los ecotipos Bd21-Bd2-3 y son Up-Up, Up-dwn, Up-cons, Dwn-Cons, Dwn-Dwn, Cons-Up, Cons-Dwn (Tabla 12). Este análisis se verificó también con el software Fuzzy K-mean para análisis de Differential Gene Expression que mostró resultados similares (ver disco compacto).



**Figura 12. Diagrama de Venn de transcritos regulados exclusiva y comúnmente en los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd21 y Bd2-3 en 48 h de estrés por inundación.**

A) Regulados positivamente B) Regulados negativamente. FDR < 0.05 x 10<sup>-5</sup>; Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5 or ≤ -1.5.

En los transcritos regulados positivamente durante el estrés por inundación en ambos ecotipos (Up-Up), se encontraron genes previamente reportados dentro del grupo de los Genes Centrales de hipoxia (GCH; Mustroph *et al.*, 2009) como *ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH, Bradi4g22620)*, *PYRUVATE DECARBOXYLASE (PDC, Bradi1g65440)*, *UNIVERSAL STRESS PROTEIN (HUP, Bradi2g20680)*, *SUCROSE SYNTASE (SUS1, Bradi46670)* y ERFs VII, *RELATED TO AP 2.12 (RAP 2.12, Bradi1g72457, Bradi3g60120, Bradi1g46690, Bradi4g31040) (RAP2.3, Bradi2g27920) APETALA 2 (AP2, Bradi2g11890)*.

Otros grupos regulados positivamente son los procesos de fosforilación, modificación de proteínas, procesos metabólicos del fosforo donde se encontraron genes como *PROTEIN KINASE (PK, Bradi1g05090)*, *CYSTEIN RICH KINASE (CRK, Bradi1g12377)*, *RECEPTOR LECTIN KINASE (RLK, Bradi1g46690, Bradi1g23730)* y factores de transcripción ERFs VII *APETALA 2 (AP2, Bradi3g60120, Bradi4g31040, Bradi1g46690, Bradi2g11890)*. Estos datos indican, como se esperaba, que *B. distachyon* responde con los GCH característicos de la bioquímica anaerobia de forma similar a otras plantas que se han analizado como *Arabidopsis*, *Rumex* y arroz. De tal forma, la diferencia en la tolerancia se podría encontrar en grupos de acción alternativa o periférica a los GCH.

Los regulados hacia abajo en común (Dwn/Dwn) pertenecen al grupo de respuesta a químicos, procesos fotosintéticos, biosíntesis y metabolismo de péptidos, transporte y localización. Estos genes indicarían mecanismos prescindibles durante el estrés por inundación. En el caso de los procesos fotosintéticos se apagarían para disminuir la inversión energética en un proceso deprimido por la disminución de la energía luminosa.

De los grupos diferenciales, el más informativo resultó ser Up-Cons, pues se encontraron genes involucrados en procesos de óxido reducción (GO: 0055114), biosíntesis y metabolismo de trehalosa (GO: 0005992, GO: 0005991), respuesta a estrés oxidativo (GO: 0006979), respuesta a auxinas, a sustancias tóxicas, metabolismo y modificación de aminoácidos. La pertenencia a este grupo, indica que se regulan positivamente durante el estrés en Bd21, pero que en Bd2-3 se expresan

constitutivamente aún en la condición control. Dicho de otra manera, son genes que se encuentran más expresados en Bd2-3 sin necesidad de someterse a estrés por inundación. La identidad de estos genes es de enzimas de respuesta a estrés oxidativo como *PEROXIDASE* (*PER*, Bradi3g09100, Bradi1g17860), *OXIDOREDUCTASE* (Bradi4g39950), *ASCORBATE PEROXIDASE* (*ASP*, Bradi4g05190, Bradi4g27680), *CYTOCHROME P450* (*P450*, Bradi2g10294), *HAEMOGLOBIN1* (*HB1*, Bradi1g37100, Bradi1g69320, Bradi2g19690) y *NITRATE REDUCTASE* (*NR*, Bradi3g37940, Bradi3g57680, Bradi3g57990).

Este conjunto de genes permite inferir que la tolerancia superior al estrés del ecotipo Bd2-3 en comparación con Bd21, pudiera deberse a la diferencia en la regulación de los genes encargados de respuesta al estrés oxidativo que se presenta durante y después de la inundación (Fukao *et al.*, 2011). Bd2-3 se encontraría preparado al expresar de forma constante a estos genes, mientras que Bd21 debe invertir energía en inducirlos durante el estrés.

#### **6.4 Determinación de estrés oxidativo *in situ***

Para determinar si existe una afectación histológica diferencial como respuesta al estrés oxidativo como indica el RNA-Seq, se realizaron tinciones en hojas de todos los ecotipos para detectar la acumulación de superóxido (mediante azul de trazolium, NBT) y de peróxido de hidrógeno (mediante diaminobenzidina DAB).

En Bd21 con NBT se observó tinción azul que indica la presencia de superóxido aún en condiciones de crecimiento normal y se acentuó en el estrés (Figura 13). Al observar en un estereoscopio a 4X, la coloración se incrementó hacia la parte media de las venas. En el resto de los ecotipos más tolerantes no se observó coloración por superóxido en condiciones normales o fué menor a Bd21. En el caso de las hojas sometidas a estrés, el resto de los ecotipos mostró una tinción menos intensa (Figura 13).

**Tabla 12. Análisis de ontología de genes de ecotipos de *Brachypodium distachyon* sometidos a estrés por inundación por 48 h.**

Las categorías de comparación son en el orden Bd21-Bd2-3 de los transcritos seleccionados por FDR < 0.05 × 10<sup>-5</sup>, Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5 o ≤ - 1.5. Regulación constante (cons), regulación hacia arriba (up), regulación hacia abajo (dwn).

GO TERM	GENES	cons-up	dwn-cons	up-up	cons-dwn	dwn-up	up-cons	dwn-dwn
Protein phosphorylation GO:0006468	46/32/48	2.40E-08		0.001645			1.64E-05	
Phosphorylation GO:0016310	54/34/54	5.85E-08		0.004678			9.53E-06	
Cellular protein modification process GO:0006464	56/39/4/50	2.37E-06		0.003964		0.0466	0.00199	
Protein modification process GO:0036211	56/39/4/53	2.37E-06		0.003964		0.0466	0.001391	
Macromolecule modification GO:0043412	52/39/53	3.24E-05		0.00884			0.003934	
phosphate-containing compound metabolic process GO: 0006796	56/37/62	1.44E-05		0.027412			2.80E-05	
phosphorus metabolic process GO:0006793	56/32/37	1.62E-05		0.029008			1.61E-05	
Peptidyl-tyrosine phosphorylation GO:0018108	29 / 22	2.85E-05					0.042674	
Peptidyl-tyrosine modification GO:0018212	29/22	2.85E-05					0.042674	
Peptidyl-amino acid modification GO:0018193	30	1.10E-04						
Response to endogenous stimulus GO:0009719	5	2.22E-02						
Response to toxic substance GO:0009636	9 / 14	5.11E-03	0.008421					
Response to auxin GO:0009733	5	3.44E-03						
Response to chemical GO:0042221	15/20/3/14	0.001107	0.31592			2.54E-05		1.75E-03
Aromatic amino acid family metabolic process GO:0009072	5 / 3 / 4	0.00142		0.03288		4.87E-02		
Response to oxidative stress GO: 0006979	9 / 12	2.89E-03	0.022807					
Oxidation-reduction process GO: 0055114	37/33/55/38	2.73E-02		0.016166	5.48E-05			0.006695
Carboxylic acid metabolic process GO:0019752	14/19	4.80E-02		1.03E-04				
photosynthesis, light harvesting GO:0009765	12 / 3		1.40E-13					0.003582
photosynthesis GO:0015979	24		6.99E-10					
Photosynthesis light reaction GO:0019684	12		3.25E-06					
Translational elongation GO:0006414	33		3.08E-13					
Translation GO: 0006412	35		5.92E-04					
Peptide biosynthetic process GO:0043043	35		2.22E-03					
Peptide metabolic process GO:0043604	35		3.59E-03					
Cellular amide metabolic process GO:0043603	35		6.64E-03					
Glycine catabolic process GO:0006546	2		7.09E-03					
Defense response GO:0005962						2.67E-04		
Oxoacid metabolic process GO:0043436	19			1.30E-04				
Organic acid metabolic process GO:0006082	19			1.36E-04				
Single organism metabolic process GO:0044710	55/86			0.010194	2.03E-03			
single organism process GO:0044699	127				4.34E-03			
Transport GO:0006810	37/ 41						0.040531	0.010581
Establishment of localization GO: 0051234	37 / 41						0.04262	0.11197
Localization GO:0051179	37 / 41						0.044791	0.011843
Transmembrane transport GO:0055085	21 / 28						0.006035	0.033727
Detoxification GO:0098754	14		0.008421					
Amide biosynthetic process GO:0043603	35		0.003586					
Single organism transport GO:0044765	36						0.003507	
Single organism localization GO:1902578	36						0.004086	
Cellular amino acid metabolic process GO:0006520	12						0.00843	
Metal ion transport GO:0030001	10						0.008517	
Single-organism cellular process GO:0044763	73						0.044487	
Threolose biosynthetic process GO:0005992	2	0.039345						
Threolose metabolic process GO:0005991	2	0.043246						

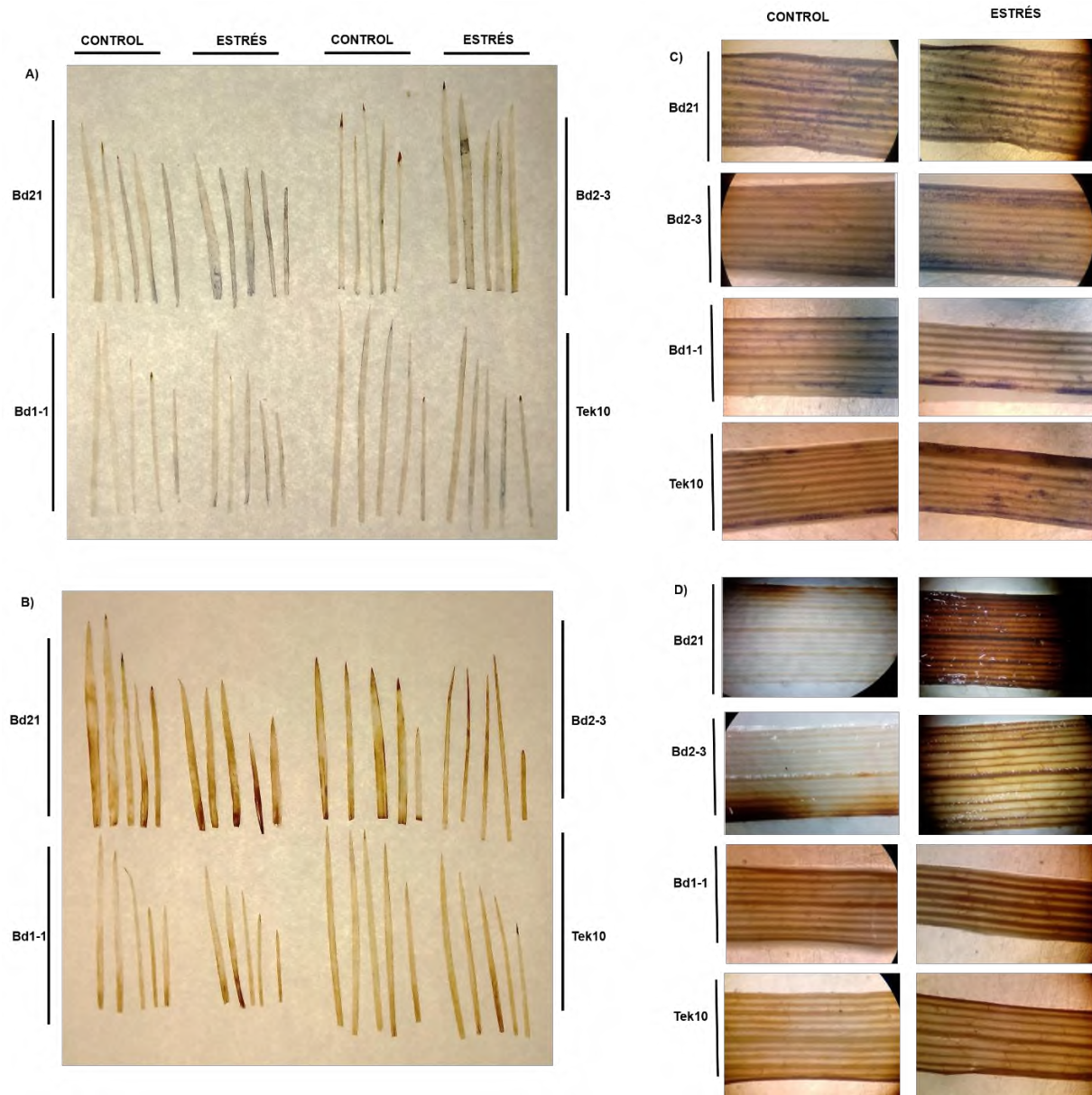
La tinción de DAB indicó de color café la acumulación de peróxido. Se detectó una acumulación muy marcada en Bd21, menos en Bd2-3 y apenas detectable en Tek10 y Bd1-1 en condiciones de crecimiento normal. En estrés, se observó en Bd21 la mayor tinción mientras que en el resto de los ecotipos se mantuvo similar o ligeramente superior al control. En la visualización a 4X, se confirmó que la coloración es más intensa en Bd21.

Debido a que las especies reactivas de oxígeno (ERO) atacan constantemente a las células, incluso en condiciones de crecimiento normal, los organismos necesitan mecanismos de atenuación de este daño. La acumulación de las ERO pueden causar un daño celular irreversible a nivel de ADN y en la organización de la cromatina, lo que imposibilita la transcripción de genes (Vanlerberghe, 2013).

De estas pruebas histológicas se concluye que sí hay un daño mayor en las hojas del ecotipo sensible Bd21. Se puede inferir que el manejo de las ERO durante el estrés, no se lleva a cabo eficientemente por Bd21 y esto impacta en su capacidad de supervivencia. De tal forma, la muerte se puede deber a la pérdida de funciones celulares a causa de las ERO. En Bd2-3 y el resto de los ecotipos tolerantes estudiados, a pesar de también estar expuestas al estrés de ERO, podrían tener la capacidad de seguir con sus procesos metabólicos básicos aunque disminuidos, es adecuado para soportar al estrés oxidativo resultante de la inundación.

### **6.5 Oligonucleótidos para análisis de expresión en qPCR.**

Una vez determinados mediante el análisis de ontología los grupos movilizados diferencial y significativamente en los ecotipos contrastantes, se realizó el diseño de oligonucleótidos para llevar a cabo la dinámica de expresión mediante qPCR en los ecotipos Bd21 y Bd2-3, durante las primeras 12 h de estrés bajo el efecto del ciclo diurno. Para este experimento se seleccionaron transcritos que representaran grupos de expresión diferencial y que tuvieran un papel significativo en la inundación.



**Figura 13. Detección de superóxido y peróxido de hidrogeno en *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.**

Se muestran las hojas de una planta de los ecotipos que se indican después de 24 horas de inundación. A) Tinción con NBT, la coloración azul indica presencia de superóxido. B) Tinción con DAB, el color rojizo indica la presencia de peróxido. C y D) Imágenes de estereoscopio (4X) de las hojas teñidas con NBT y DAB respectivamente. El experimento se repitió dos veces con los mismos resultados.

De tal forma, se escogieron a *ALTERNATIVE OXIDASE 1* (estrés oxidativo; *AOX1*, Bradi5g20547) *HAEMOGLOBIN 1* (estrés oxidativo; *HB1*; Bradi1g69320), *ALPHA AMYLASE 1* (metabolismo de almidón; *AMY1*; Bradi3g58010), *ALCOHOL DEHYDROGENASE 1* (hipoxia; *ADH1*; Bradi4g22620), *TRIACYLGLYCEROL LIPASE LIKE 1* (metabolismo de lípidos; *TLL1*; Bradi2g35450). Los cinco genes seleccionados representan a los grupos de transcripción utilizados para realizar el análisis de ontología de genes de acuerdo al valor Log<sub>2</sub>FC además de ser representantes de los principales grupos movilizados en respuesta al estrés (Tabla 13).

Para probar en PCR a los oligonucleótidos que se diseñaron (Tabla 13) se llevó a cabo la extracción de gDNA de ambos ecotipos y se determinó la calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Anexo 2). La banda muestra alto peso molecular con respecto al marcador, lo que nos indica la presencia y calidad del DNA extraído (Figura 14).

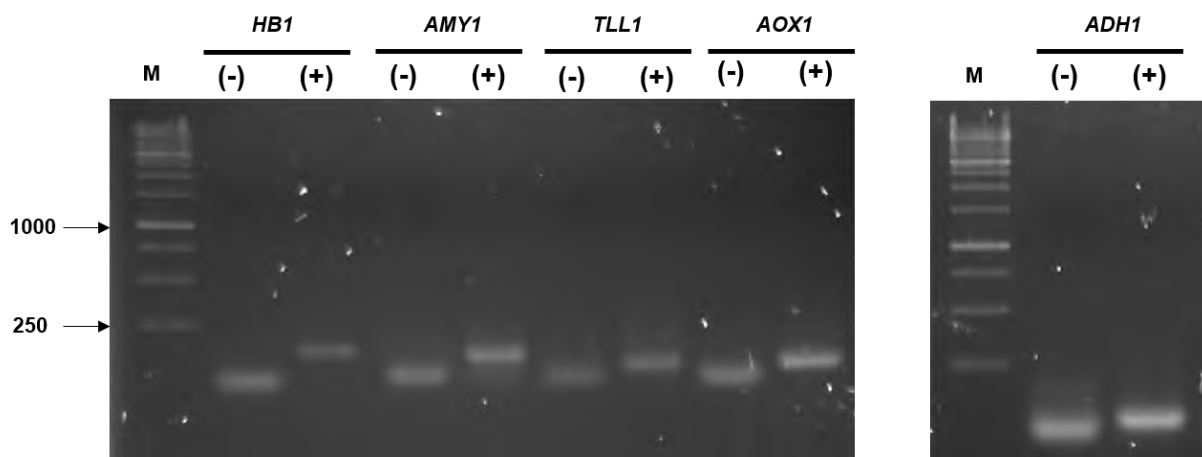
## **6.6 Selección de los tiempos de colecta, extracción y control de calidad de RNA para el análisis de expresión en qPCR.**

Se realizó la colecta de acuerdo a los tiempos descritos en la metodología (Tabla 5) con el Zeitgeber Time (ZT) 13 como el tiempo 0, es decir, tres horas antes de la oscuridad. Esta decisión se basó en experimentos previos donde se mostró que en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* algunos genes que muestran comportamientos oscilatorios durante el inicio y final de la noche, se alteran por la inundación y son determinantes en el desarrollo de las plantas, por ejemplo, la floración (Peña-Castro *et al.*, 2011).

**Tabla 13. Oligonucleótidos de *Brachypodium distachyon* diseñados para cuantificar su expresión en qPCR.**

Se muestra el nombre del gen, la secuencia de amplificación final, el tipo de transcripción en el ecotipo sensible (s) – tolerante (t), el porcentaje de eficiencia, R, el tamaño de amplicón y la temperatura adecuadas para el análisis.

Nombre	Gen	Abreviatura	Secuencia	Expresión (S-T)	Efic %	R2	Amplicón	Tm
HAEMOGLOBIN 1	<u><i>Bradi1g69320</i></u>	HMB_F	ACGCCGTGTCTGTCTTTATC	up-cons	82.5	0.93	128	62
		HMB_R	ATCTGCCACGCCGTATTT					
ALTERNATIVE OXIDASE 1	<u><i>Bradi5g20547</i></u>	AOX_F	GAGTCTTCTTCAACGCCTACTT	up-dwn	109.3	0.99	100	62
		AOX_R	GTATAAGACTTCACGGCCTCTTC					
TRYACYLGLYCEROL LIPASE LIKE 1	<u><i>Bradi2g35450</i></u>	TRIGLI_F	CGTCGAGGATGTCGTTATCAA	dow-cons	103.5	0.95	96	62
		TRIGLI_R	CGGTATGCCAGTAGTCGTTATT					
ALCOHOL DEHYDROGENASE 1	<u><i>Bradi4g22620</i></u>	ADH2_F	GAGTACACCGTGATCCATGTC	up-up	102.8	0.99	104	62
		ADH2_R	GCACCAAGACCAGTTGAAATAC					
ALPHA AMYLASE 1	<u><i>Bradi3g58010</i></u>	AMY_F	GGAGCCCATGCATCTTCTATG	up-cons	109.3	0.99	108	62
		AMY_R	GCTTGCTGTCCTTGTGGAT					

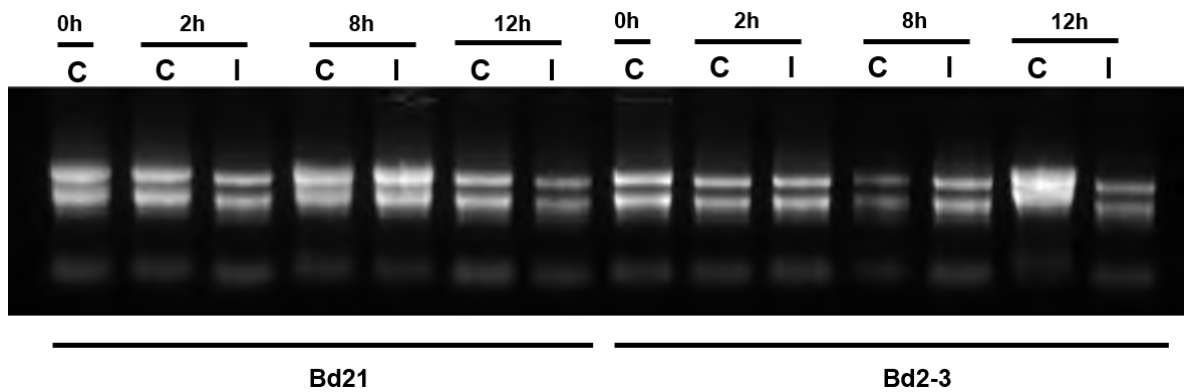


**Figura 14. Comprobación de amplificación por los oligonucleótidos diseñados en gDNA de *Brachypodium distachyon* Bd21.**

El tamaño de banda esperado de cada par de oligonucleótidos seleccionados está en la Tabla 13.

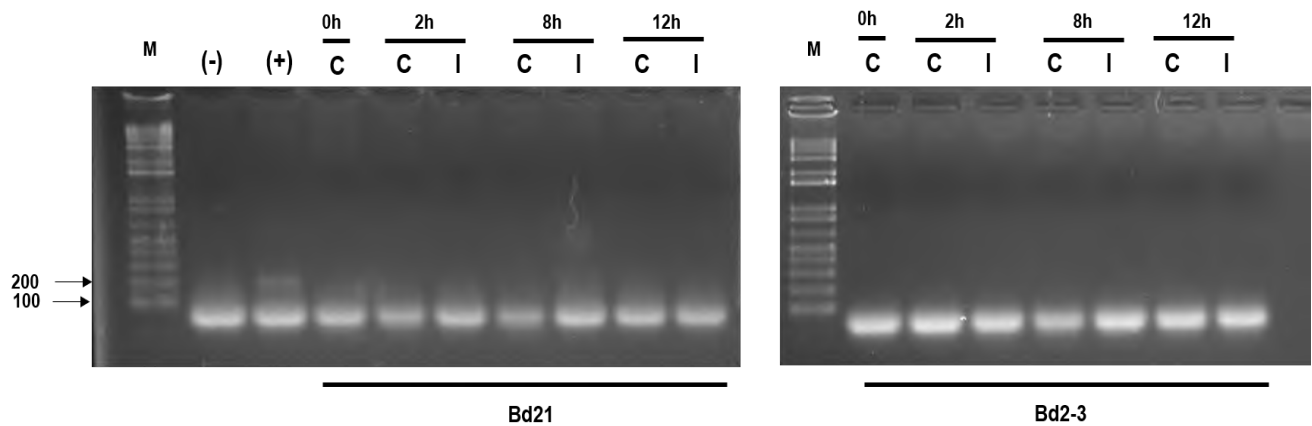
Se determinó utilizar las muestras correspondientes a colectas de 0, 2, 8 y 12 h de estrés debido a que estos tiempos abarcarían la última hora de la noche, la primera del día y toda la fase oscura.

Para realizar el control de calidad de las extracciones de RNA que se usarían en la cuantificación de la expresión, primero se verificó su calidad e integridad en gel de agarosa 1% donde no se encontró degradación de las dos bandas del ribosoma (Figura 15). El siguiente paso fue corroborar la ausencia de gDNA en las muestras, utilizando el gen *ACTIN* (Bradi2g24070; Figura 16).



**Figura 15 .Verificación de integridad de las muestras de RNA de *Brachypodium distachyon* para qPCR.**

Gel de agarosa 1% donde se muestra la integridad de las dos subunidades de RNA ribosomal en los 4 tiempos en condiciones control (C) e inundación (I) de los ecotipos Bd21 y Bd2-3.



**Figura 16. Verificación de ausencia de gDNA en extracciones de RNA de *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.**

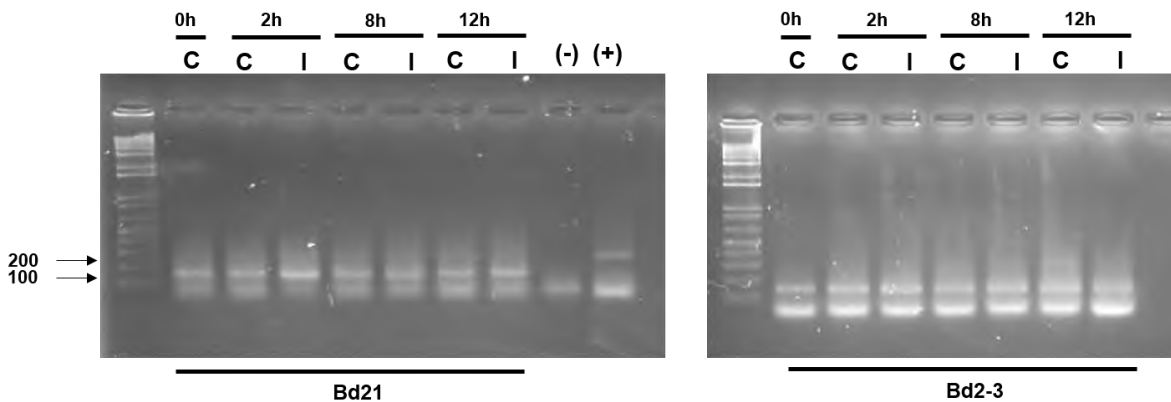
Se utilizó como control positivo el gen constitutivo de actina para los dos ecotipos. No se observa amplificación excepto en el positivo (+). Control (C), inundación (I).

De las muestras anteriores se sintetizó cDNA y se usó como molde en PCR con oligonucleótidos del gen Bradi4g31040 como control que amplifica una banda de 250 pb tamaño si hay presencia de gDNA. No se observaron productos de gDNA en los cDNAs (Figura 17).

La eficiencia en la amplificación de cada oligo se probó en diluciones de 1:4 a 1:16, 1:64: 1:256 y se obtuvieron los porcentajes de la Tabla 13 que están en el rango de 90-120 óptimo para qPCR., excepto en el caso de *HB1* que se encontró ligeramente inferior. También se calculó la  $R^2$  para verificar la variabilidad en los valores de amplificación., ya que todas son superiores a 0.9 se tomaron como adecuadas.

### 6.7 Análisis cuantitativo en qPCR para determinar la expresión de los genes diferenciales.

El análisis de expresión por qPCR reveló el comportamiento de los genes seleccionados en condiciones de control y estrés (Tabla 14), en una cinética de expresión con las muestras ZT13, ZT15, ZT22, ZT2, que abarcan las primeras doce horas de estrés (Figura 18).



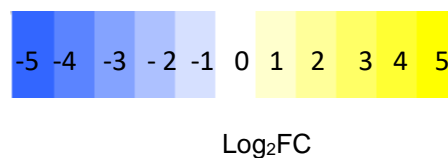
**Figura 17. Verificación de cDNA de ecotipos de *Brachypodium distachyon* durante estrés por inundación.**

Se observa la amplificación de 250pb del gen Bradi4g31040 a partir de gDNA (+) y ninguna en el negativo (-) donde no se agregó molde. La banda de 150 pb corresponde a la amplificación de cDNA.

**Tabla 14. Expresión en valor Log<sub>2</sub>FC de los genes de *Brachypodium distachyon* seleccionados para el análisis en qPCR.**

El color indica la regulación de la transcripción. 21s: Bd21 sumergido, 21c: Bd21 control, 2-3s: Bd2-3 sumergido, 2-3c: Bd2-3 control, Up: movilizados hacia arriba, Cons: transcripción constante, Dwn: movilizados hacia abajo. FDR < 0.05 x 10<sup>-5</sup>; Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5 or ≤ -1.5.

Nombre	Gen	21s/21c	21c/2-3c	21s/2-3s	2-3s/2-3c	Grupo 21/2-3
Hemoglobina ( <i>HB1</i> )	Bradi1g69320	8.1	-7.8	-0.3	0.6	up-cons
Oxidasa alternativa ( <i>AOX</i> )	Bradi5g20547	3.9	-4.3	3.5	-3.9	up-dwn
Lipasa ( <i>TLL</i> )	Bradi2g35450	-6.4	3.4	-2.5	-0.4	dow-cons
Alcohol deshidrogenasa ( <i>ADH1</i> )	Bradi4g22620	8.4	-1.4	-0.2	7.1	up-up
Amilasa ( <i>AMY</i> )	Bradi3g58010	3.8	-3.1	-0.6	1.3	up-cons



Como se esperaba de los datos de RNA-Seq, el gen *ADH1* se indujo en condiciones de estrés en ambos ecotipos sin una diferencia significativa, mientras en control permaneció 100 veces menos abundante sin responder a la noche (Figura 18 A). Se seleccionó como un gen prototípico del grupo Up-Up, por su papel en la respuesta bioquímica anaerobia durante el estrés por hipoxia (Bailey-Serres *et al.*, 2013; Banti y Giuntoli, 2013).

En el caso de *AMY*, en condiciones de control se muestra con mayor regulación en Bd2-3 (Figura 18 B). Al participar en la degradación de almidón, se observó que se transcribió más al inicio de la noche y disminuyó al avanzar la noche. Sin embargo, se mostró la separación significativa en el pico máximo entre los dos ecotipos con una expresión mayor en condiciones normales en Bd2-3 mientras que en Bd21 no se observa respuesta a la noche. En inundación, se aumentó hasta 40 veces más la expresión y se recorrió la fase máxima 6 h de la noche hacia el día y con mayor intensidad en Bd21. Esto podría deberse a que durante el estrés, las plantas responderían almacenando la mayor energía posible en forma de almidón, y por ello es necesario adelantar la actividad de esta enzima para poder responder mejor a la

crisis de hipoxia y principalmente a la ausencia de luz. El ecotipo tolerante respondió con menor intensidad, lo que indica que estaría administrando mejor el consumo de almidón, como se observó en cultivares tolerantes de arroz (Fukao *et al.*, 2006).

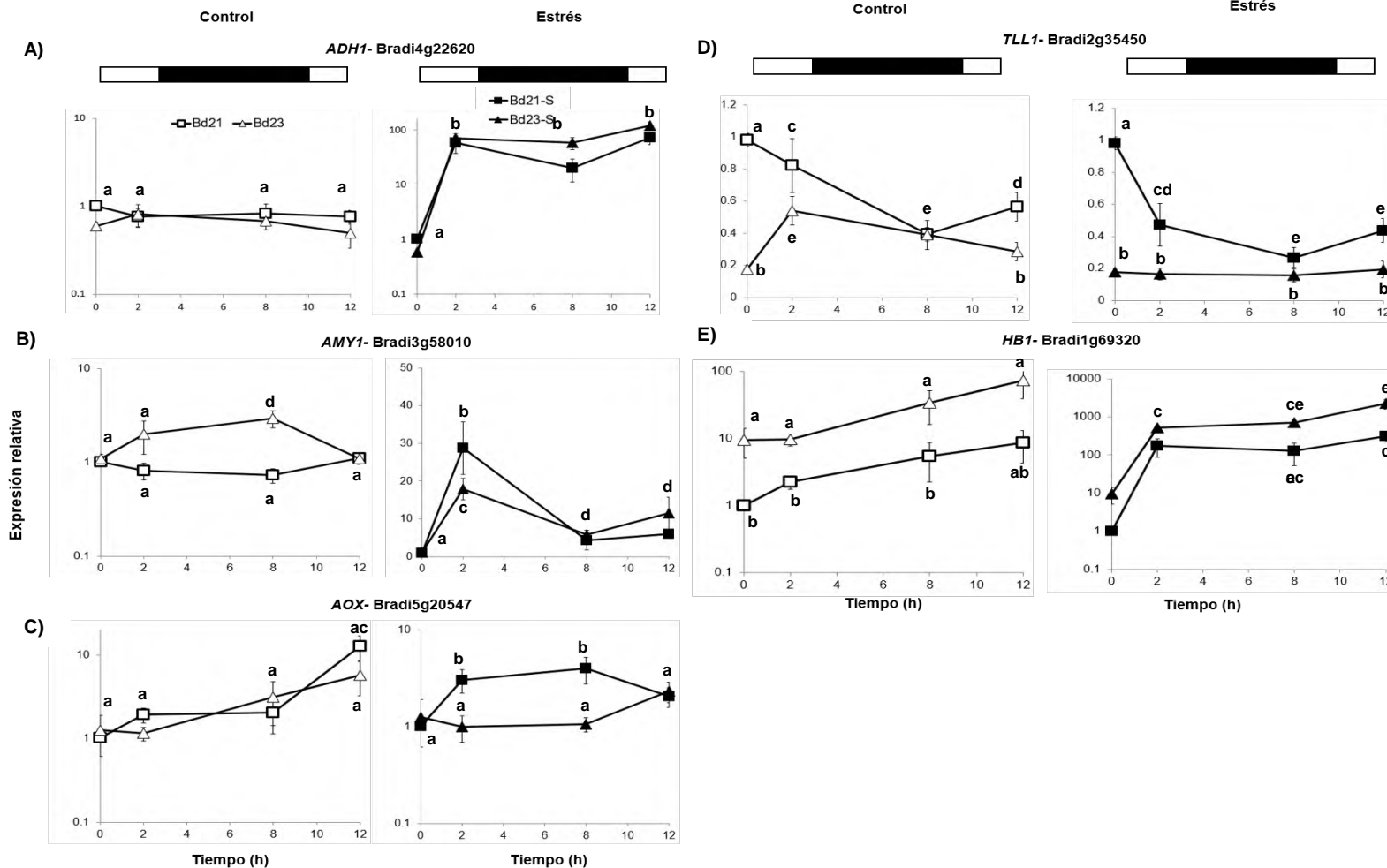
El transcrito de *AOX* mostró una expresión constitutiva en condiciones de control en ambos ecotipos. Mientras que en condiciones de estrés se separa de forma inducible en Bd21 (sensible) y aumenta su regulación durante la noche; en Bd2-3 (tolerante) permanece insensible al estrés y a la noche (Figura 18 C).

Como se esperaba a partir del análisis transcriptómico, el gen *TLL1* mostró una inhibición de su transcripción (Figura 18 D). Con su seguimiento en cinética, se observó que tiene una expresión oscilatoria contrastante entre ecotipos durante la noche en condiciones de control. Durante el estrés, en Bd2-3 permaneció con una transcripción mínima y constante.

En combinación con los resultados de GO que indicó que muchos de los genes reprimidos pertenecen al metabolismo de lípidos, esta respuesta durante el estrés se puede generalizar en el contexto de los lípidos como almacenadores de energía en células y semillas, defensa contra patógenos y fluidez de la membrana. Se puede hipotetizar que Bd21 en condiciones de estrés al mantener la transcripción de este gen, gasta recursos importantes que pudieran ser invertidos en otros procesos que le confieran una mejor tolerancia al estrés. Por otra parte, Bd2-3 limita la transcripción de la lipasa, lo que le permitiría conservar estos lípidos y ser una de las ventajas sobre el ecotipo sensible.

Por ejemplo una vía para mantener la homeostasis lipídica es mediante la *ACYL COENZYME A BINDING PROTEIN* (ACBP) que promueve la generación de la cadena lipídica para la restauración de la membrana (Zhang *et al.*, 2012). *HB1* en Bd21 tuvo una transcripción en condiciones de control menor a Bd2-3, salvo durante el amanecer, probablemente en respuesta al choque oxidativo diurno.

Este resultado indica que Bd2-3 está mejor preparado para responder al estrés oxidativo y colocaría a *HB1* como una enzima crucial de la tolerancia.



**Figura 18. Análisis cuantitativo en qPCR durante las primeras 12 horas de estrés por inundación de cinco genes seleccionados de *Brachypodium distachyon*.**

Los valores están normalizados al tiempo. Las barras blancas y negras indican día y noche respectivamente. Los valores presentados son el resultado de la expresión de tres experimentos independientes con duplicados técnicos, normalizados con *UBIQUITIN* (*Bradi1g32860*). Las letras indican diferencias entre los ecotipos y el tiempo en estrés calculado por una prueba de ANOVA de dos vías  $p < 0.05$ .

Durante el estrés, ambos ecotipos expresaron intensamente a *HB1*, sin embargo, en Bd2-3 se mantuvo significativamente su expresión un orden de magnitud por encima de Bd21 (Figura 18 E).

Tomando en cuenta de manera conjunta los resultados de expresión de *AOX* y *HB1* con la histología de especies reactivas de oxígeno, se puede concluir que el ecotipo tolerante se encuentra preparado incluso en condiciones normales para enfrentarse a los cambios en el ambiente ocasionados por el estrés oxidativo con la participación de la hemoglobina como primera línea de defensa. Por otra parte, el ecotipo sensible debe utilizar a la oxidasa alternativa para responder al estrés oxidativo. Este manejo diferencial podría ser determinante en la respuesta, debido a que Bd21 requiere invertir energía para inducir a *AOX* y detoxificar electrones que no participan en la síntesis de ATP, mientras que Bd2-3, al tener una transcripción constitutiva de *HB1*, puede protegerse del estrés oxidativo y mantener intactas las vías de obtención de energía.

## **7. Modelo de tolerancia al estrés por inundación.**

Con los datos de RNA-Seq, de fisiología e histología vegetal y de análisis de expresión, se puede proponer un modelo que explique en estos niveles la mayor tolerancia de Bd2-3 con respecto a Bd21. Para ello, se analizaron nuevamente los grupos GO pero ahora también en el contexto de familias génicas y tomando en cuenta abundancia y estado de expresión en condición control. Adicionalmente, se exploraron de forma manual mecanismos conocidos de la respuesta a inundación como el metabolismo primario y la inhibición de la floración.

### **7.1 Manejo de estrés oxidativo y procesos de óxido reducción.**

A nivel de transcripción, el análisis GO del transcriptoma mostró los grupos de respuesta al estrés oxidativo (GO: 006979) y de óxido reducción (GO: 0055114) regulados de forma diferencial en los ecotipos. Mientras en Bd2-3 tienen una

regulación de diferentes subgrupos en ambas condiciones, Bd21 los regula negativamente (Tabla 12). Dentro de estos grupos se encuentran 35 transcritos para enzimas reguladoras de especies reactivas de oxígeno y del ciclo del óxido nítrico como *PEROXIDASE* (Bradi2g60860, Bradi1g27920), *NADH OXIDOREDUCTASE* (Bradi1g47700), *ASCORBATE OXIDASE* (Bradi4g34690), y *CYTOCHROME P450* (Bradi3g22840, Bradi2g10294). Este grupo de genes se reguló positivamente en Bd2-3 en estrés mientras que en Bd21 se mantuvo constante en la expresión (Figura 19 A). Aun así, Bd2-3 tiene una expresión más intensa de estos transcritos en inundación. De tal forma, Bd2-3 parece tener un mecanismo río arriba que contiene al estrés oxidativo y evita que llegue a saturar los mecanismos de defensa a nivel de superóxido y peróxido que de cualquier forma, se expresan mejor que en Bd21.

Un mecanismo de defensa oxidativa pasivo que se detectó involucra a las tres *NITRATE REDUCTASE* (NR) en Bd2-3 que en Bd21, se regulan negativamente de manera más fuerte durante la inundación (Figura 19 B). Las NR, además de participar en el metabolismo normal de nitrógeno, también participan en la producción de óxido nítrico (NO), una fitohormona y especie reactiva de oxígeno. Durante condiciones normales, el NO es una molécula esencial para la degradación de los ERFs-VII (Gibbs *et al.*, 2014). Así, se puede hipotetizar que la disminución de la expresión de *NR* tendría como consecuencias tanto la disminución de estrés oxidativo así como la estabilización de la señalización molecular por ERFs.

Adicionalmente, se encontraron cinco oxidasas alternativas de las cuales dos (Bradi5g20557 y Bradi5g20547) muestran una transcripción positiva en Bd21 en comparación con Bd2-3 lo que indicaría que Bd21 necesita invertir recursos en el manejo de ROS río abajo de NR (Figura 19 C)

La producción de NO se puede limitar de forma pasiva regulando negativamente a las NR, pero también de forma activa mediante el ciclo de la proteína hemoglobina que cataliza la destoxificación de NO en  $\text{NO}_3^-$  (Hill, 2012). En el transcriptoma, también se encontró dentro del grupo de estrés oxidativo al gen de *HAEMOGLOBIN 1* (HB1, Bradi1g69320) que mostró una expresión diferencial significativa en condiciones

control, pues mientras que en Bd21 se expresa muy poco (0.14–0.19 CPM), en Bd2-3 ya se encuentra presente (26.2–69.2 CPM; Figura 19 D).

Los cambios de transcripción de las enzimas reguladoras de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno permiten proponer que existe un manejo diferencial homeostático de NO mediante el ciclo de hemoglobina. Debido a que estudios previos mostraron que SUB1A orquesta la regulación de sistemas antioxidantes, mediante la inducción de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa en especies de arroz, se mejoraría la tolerancia al estrés oxidativo (Fukao *et al.*, 2011).

Se buscaron otros componentes del ciclo de la hemoglobina como las NADPH Oxido reductasas y la aconitasa, pero no fueron diferenciales o regulados positivamente en ambos ecotipos, respectivamente (Figura 19 E, F)

La inducción de HB1 se reportó previamente en *Arabidopsis thaliana* (Watts *et al.*, 2001), alfalfa (*Medicago sativa*; Igamberdiev *et al.*, 2004) y arroz (Narsai *et al.*, 2010) en estrés hipóxicos y anóxicos, y se sugiere que cumple la función como regulador del estado antioxidante de la célula (Hill, 2012). No obstante, no se había encontrado como un factor contrastante de tolerancia entre variedades y ecotipos. En otro trabajo paralelo e independiente al presente (Campbell *et al.*, 2015), una hemoglobina constitutiva también se encontró como parte de un QTL de tolerancia a la inundación en variedades de maíz. De tal manera, el ciclo de la hemoglobina y en especial la expresión constitutiva de HB1, surgen como un conocimiento sólido de futura aplicación biotecnológica para aumentar la tolerancia a la inundación en monocotiledóneas.

Estos datos de transcripción sumados a las observaciones fisiológicas por tinción y la expresión diferencial detectada en qPCR, nos hacen suponer que Bd21 es más sensible al estrés oxidativo incluso en condiciones control por que debe invertir energía para la transcripción de genes de protección, ya que transcribe positivamente genes de acción río abajo en la remoción. Mientras que Bd2-3, al tener una buena regulación en la transcripción de la hemoglobina, la usa para ayudar a las enzimas encargadas de regular los complejos antioxidantes y de desintoxicación desde etapas tempranas de la generación de estrés y tiene un manejo eficiente del estrés oxidativo

durante y probablemente después del estrés por inmersión. La remoción de NO también tendría un impacto positivo en la estabilidad de los ERFs y podría, en el nivel traduccional, también determinar al ecotipo Bd2-3 como tolerante y a Bd21 como sensible.

## 7.2 Grupos de fosforilación en respuesta a patógenos.

Otros de los principales grupos movilizados en el análisis de ontología fueron los de proteínas de fosforilación (GO: 0006468) y fosforilación (GO: 0016310) y el grupo de defensa (GO: 0006952). Dentro de ellos, se agruparon dos tipos de transcritos: aquellos que se expresaron constitutivamente en Bd21 y en control y positivamente en Bd2-3 y en inundación, y aquellos que se regularon positivamente en Bd21 pero sin alcanzar la expresión de Bd2-3.

La mayoría de los genes transcritos pertenecen a las quinasas de pared celular y a proteínas de *DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 26 (DUF26)*, Figura 20).

Los genes *DUF26* se transcriben ante la respuesta a hongos patógenos, por ejemplo, la proteína *GINKBILOBIN2 (Gnk2)* de *Ginkgo biloba* une carbohidratos característicos de la pared celular del hongo e inhiben el crecimiento del hongo (Miyakawa *et al.*, 2014).

Otros genes codificados en este grupo fueron cinasas de distintas familias que en *Arabidopsis thaliana*, se han clasificado como receptores ricos en cisteína *CYSTEINE-RICH RECEPTORS (CK)*, *LEUCINE-RICH REPEAT KINASE (LRRK)*, *LIGHT-REPRESSIBLE KINASE (LK)*, y proteínas quinasas *PROTEIN KINASE (PK)*. Wrzaczek *et al.*, (2010) observaron que responden a la muerte celular programada asociada a la alta exposición ozono y que esta respuesta es similar al estrés por patógenos y actividad microbiana. En arroz, se encontró que la proteína de reconocimiento de patógenos microbianos *XA21* pertenece al grupo de los *LRRK* (Bahar *et al.*, 2014). Esta respuesta indicaría que Bd2-3 se encuentra preparada a nivel transcriptómico para responder a los patógenos (hongos o bacterias) acumulados por

las condiciones de estrés, movilizando principalmente los genes codificados por los dominios *DUF26* y otros del grupo de defensa.

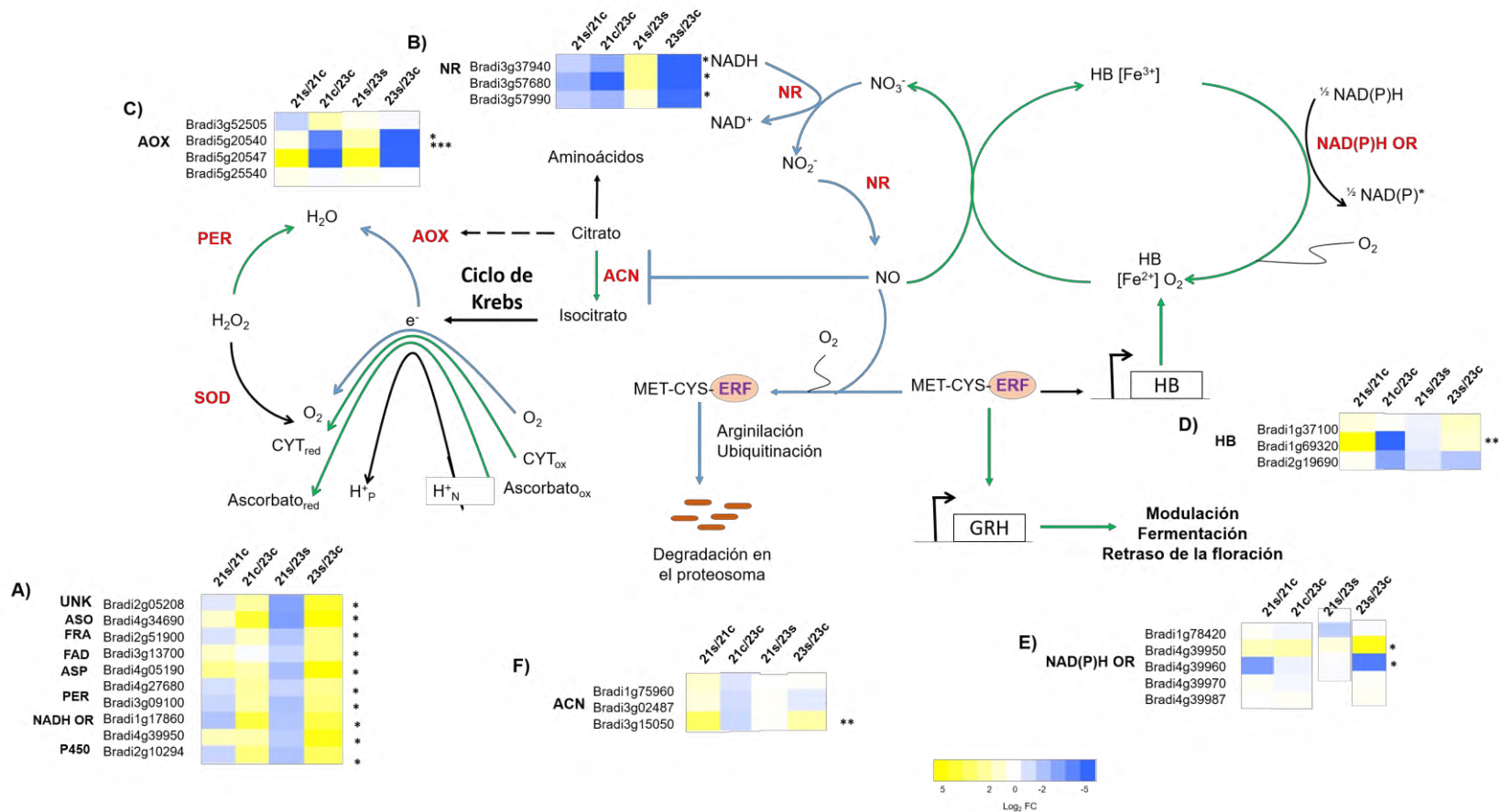
Además, con el conocimiento que existe sobre las funciones inhibitorias de crecimiento de los genes codificados por *DUF26*, y el papel de las ROS en la señalización por patógenos se puede proponer que tienen un papel importante en la respuesta positiva hacia los patógenos.

Para conocer la función específica de estos grupos de proteínas, se propone realizar un estudio de mutantes de Bd2-3 en los genes que codifican a los receptores ricos en cisteína (*LRRK*) y someterlos a diferentes tipos de estrés, por hongos y bacterias patógenos, estrés oxidativo, inundación, sequía y posteriormente analizar si existe una variación significativa en la respuesta.

### **7.3 Transporte de iones metálicos.**

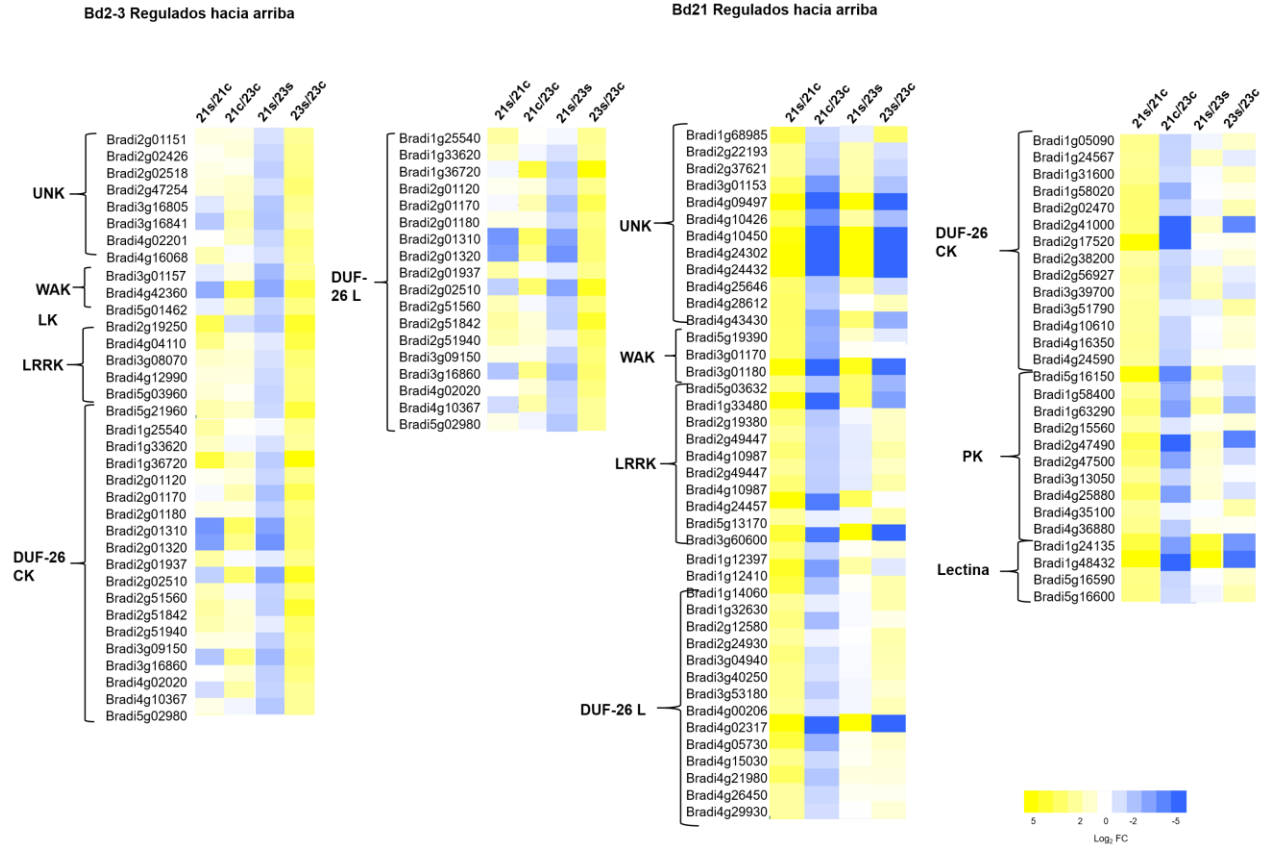
Uno de los grupos que llamó la atención por sus pocas menciones en la literatura científica fue el de transporte de iones metálicos (metal ion transport GO: 0030001). El análisis transcriptómico mostró una movilización negativa en ambos ecotipos ante el estrés y un subgrupo sólo en Bd2-3 en condiciones de estrés (Figura 21). El nivel de expresión en este grupo fue moderado (35.9 CPM).

Sólo en cebada (*Hordeum vulgare L.*) y trigo (*Triticum aestivum*) se demostró que la tolerancia al anegamiento está asociada proporcionalmente a la tolerancia a los elementos iónicos tóxicos del suelos como Mn, Fe, Na, Al y B (Setter *et al.*, 2009). La captación de estos iones debido a la toxicidad aumentada en suelos inundados, puede ser la principal causa de daños a los brotes.



**Figura 19. Integración de las rutas del manejo de estrés oxidativo en *Brachypodium distachyon*.**

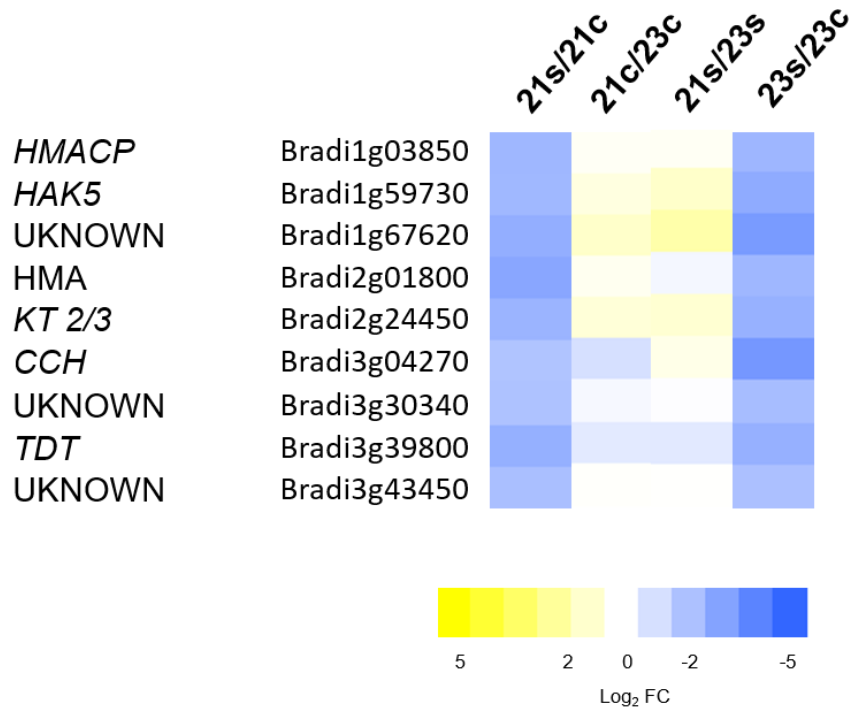
(B) NITRITE REDUCTASE (NR), (C) ALTERNATIVE OXIDASE (AOX), (A) PEROXIDASES (PER), (D) HAEMOGLOBIN (HB), transcripciones involucradas en las vías de detoxificación: UNKOWN (UNK), ASPARTATE OXIDASE (ASO), (F) ACONITASE (ACN), (E) NAD(P)H OXIDOREDUCTASE (OR). Las flechas verdes indican regulación positiva, las azules regulación negativa en Bd2-3. Los colores amarillo y azul indican regulación positiva y negativa según el valor Log<sub>2</sub>FC después de dos días de estrés determinados por RNA-seq. Abreviaturas: SOD (superóxido dismutasa), GRH (genes de respuesta a hipoxia), ERF (ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR), óxido nítrico (NO). \* Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd2-3, \*\* Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd21, \*\*\*Regulado significativa e inversamente en ambos ecotipos. FDR < 0.05 × 10<sup>-5</sup>; Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5 o ≤ -1.5



**Figura 20. Transcritos movilizados en la categoría de fosforilación en *Brachypodium distachyon* bajo estrés por inundación.**

Transcritos movilizados positivamente por Bd21 y Bd2-3 después de dos días de estrés. El color azul indica la regulación hacia abajo, el amarillo regulación positiva de acuerdo al valor de significancia  $FDR < 0.05 \times 10^{-5}$ , y un  $\text{Log}_2 \text{FC} \leq 1.5$  y  $\geq 1.5$  respectivamente. Las abreviaturas son: UNKNOWN (UNK), WALL-ASSOCIATED KINASE (WAK), LIGHT-REPRESSIBLE KINASE (LK), LEUCINE-RICH REPEAT KINASE (LRRK), DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 26 CYSTEINE-KINASE (DUF26- CK) DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 26 LECTINE (DUF26-L) y PROTEIN KINASE (PK).

La diferencia entre las plantas que acumulan y no acumulan metales se basa en la expresión de genes de transportadores de iones metálicos que operan en conjunto con compuestos orgánicos, y naturalmente funcionan como defensa de herbívoros y de la planta en general (Rascio y Navari-Izzo, 2010).



**Figura 21. Transcritos del grupo de metales, regulados negativamente en *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.  $FDR < 0.05 \times 10^{-5}$   $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1.5$  o  $\leq -1.5$**

Se puede proponer la hipótesis de que el ecotipo tolerante Bd2-3 responde a los cambios químicos en el suelo ocasionados por las condiciones de estrés. Se puede predecir que en condiciones de estrés cuenta con otros mecanismos, probablemente la regulación negativa en condiciones de estrés se debió a que la intensidad del mismo fue muy leve. Para determinarlo se podrían someter a estrés por inundación y anegamiento con mayor duración y en diferentes tipos de suelos para determinar si cambia la regulación en este grupo.

#### **7.4 Mecanismos regulados normalmente durante el estrés por inundación.**

Los mecanismos comúnmente regulados como respuesta al estrés en plantas son el ciclo de Krebs, fermentación alcohólica, glucólisis, catabolismo de almidón, transporte de metabolitos, protección al estrés oxidativo, actividad de chaperonas y la

acumulación de aminoácidos como reserva de energía (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Voesenek y Bailey-Serres, 2015).

#### **7.4.1 Los aminoácidos como reserva para la recuperación.**

Un grupo de transcritos relacionados con el metabolismo de aminoácidos se encontró dentro de procesos metabólicos de ácidos carboxílicos (GO: 0019752). Se regularon positivamente 17 transcritos en Bd21 en condición de estrés mientras que en Bd2-3 su transcripción es constitutiva y mayor que en Bd21 en ambas condiciones (Figura 22).

Los transcritos que se encontraron son *GLUTAMATE DEHYDROGENASE* (Bradi5g17330) y *GLUTAMATE AMMONIA LIGASE* (Bradi3g27877) y se activan durante la senescencia y la germinación en *Arabidopsis thaliana* (Fontaine *et al.*, 2012). En la inundación, el glutamato es un sustrato para la producción ácido aminobutirico (GABA) y tiene una función central en la homeostasis carbono-nitrógeno y la respuesta al hambre. La acumulación de GABA se ha documentado como una forma de conservar la energía no aprovechada del piruvato durante el estrés (Hildebrandt *et al.*, 2015).

También se encontró a la *LYSINE tRNA LIGASE* (Bradi1g11876), cuya presencia puede indicar que se utiliza para reforzar la incorporación de este aminoácido a las proteínas (Barding *et al.*, 2013).

Otra ruta de direccionamiento metabólico hacia aminoácidos fue la de los aromáticos por medio de *TYROSINE DECARBOXYLASE* (Bradi3g14760, Bradi3g14750), *TRYPTOPHAN SYNTHASE* (Bradi1g55440) *INDOLE-3-GLYCEROL POSPHATE SYNTHASE* (Bradi5g05430, Bradi4g08830). Esta activación puede ser un precursor de fitoalexinas, glucosilatos y alcaloides en respuesta a estrés, o como un acumulador de carbono en arroz (Ortiz *et al.*, 2000; Barding *et al.*, 2013).

La cuantificación de transcritos del metabolismo de aminoácidos con expresión diferencial en los ecotipos de *Brachypodium distachyon*, indicaría nuevamente, que el

ecotipo Bd2-3 se encuentra preparado constitutivamente para afrontar varios tipos de estrés utilizando rutas alternas para la conservación de energía como la estrategia de quiescencia. La transcripción temporal de las rutas metabólicas de degradación de aminoácidos sería de mayor importancia en la recuperación cuando se pueden reutilizar en la síntesis de proteínas, consumirse en el ciclo de Krebs o movilizarse a otros tejidos. (Barding *et al.*, 2013; Pratelli y Pilot, 2014).

Para comprobar esta hipótesis, se propone realizar una cinética del contenido de aminoácidos en diferentes tiempos durante y después del estrés a partir de que finaliza el estrés en mutantes de estas rutas metabólicas.

Otros transcritos de manejo de carbono que se encontraron son los que codifican para las enzimas *ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 3* (*ASP3*, Bradi2g50500), y *PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE* (*PPDK*, Bradi2g25745). La primera regula al metabolismo fermentativo proveyendo de una ruta de uso de glutamato y la segunda es una enzima crucial de síntesis de piruvato y recuperación de ATP a partir de fósforo inorgánico. Ambos transcritos fueron regulados positivamente en estrés, mientras que Bd2-3 mantuvo una transcripción constitutiva en ambas condiciones y mayor a Bd21. Recientemente, en *Arabidopsis* se descubrió a *PPDK* como un gen que puede explicar parcialmente la mayor supervivencia de los ecotipos tolerantes (Van Veen *et al.*, 2016).

#### **7.4.2 Regulación de mecanismos comunes de manejo de piruvato.**

Se reconstruyeron manualmente las rutas fermentativas pues el manejo de piruvato por medio del catabolismo de alanina, GABA, etanol, acetato y lactato, durante el estrés por inmersión es muy relevante para la tolerancia. Los GCH de hipoxia se encontraron regulados positivamente en ambos ecotipos en estrés por inundación.



**Figura 22. Transcritos del grupo de procesos metabólicos de ácidos carboxílicos regulados positivamente en *Brachypodium distachyon* ecotipo Bd21 en estrés por inundación.**

Se muestran los valores Log<sub>2</sub>FC de 48 h de estrés. Todos los transcritos son regulados positivamente de forma significativa en Bd21. FDR<0.05x10<sup>-5</sup> (Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5).

Estos resultados mostraron dos parámetros importantes, el primero, que el análisis transcriptómico fue realizado correctamente y el segundo, que en los mecanismos comunes de respuesta a estrés por inundación, ambos ecotipos responden de forma similar, excepto en el manejo de acetato por la vía de *ACETYL-CoA SYNTHETASE* (ACS, Bradi3g44620, Bradi5g08890) y *ALDEHYDE DEHYDROGENASE* (ALDH, Bradi2g42380, Bradi4g31310), genes que están más expresados constitutivamente en Bd2-3 (Figura 24). Estos datos indicaron que Bd2-3 podría usar la ruta del acetato como una vía alterna para producción de energía en condiciones anaerobias. Ya que el uso del acetato aun no está muy claro, estudios en hojas de *Arabidopsis* indicaron dos posibles aprovechamientos del acetato a través de

la enzima ACS, uno es permitir a las plantas usar al acetato como fuente carbono o que esté entrando en el ciclo del glioxilato (Lin y Oliver, 2008).

También se encontraron transcritos del metabolismo de los ácidos carboxílicos regulados positivamente en ambos ecotipos (GO: 0019752), *ACONITASE* y *MALIC ENZYME* además de la enzima de entrada de piruvato *PYRUVATE DEHYDROGENASE*. Su presencia indica que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos está funcionando debido a que las plantas tenían ciclos de luz / oscuridad (16h / 8 h).

### **7.4.3 Traducción de proteínas y metabolismo de lípidos.**

Dentro de los grupos que se regularon negativamente se encontraron tres grupos del metabolismo primario, traducción (GO: 0006412), fotosíntesis (GO: 0015979) y procesos metabólicos de lípidos (GO: 0006629) (Figura 23).

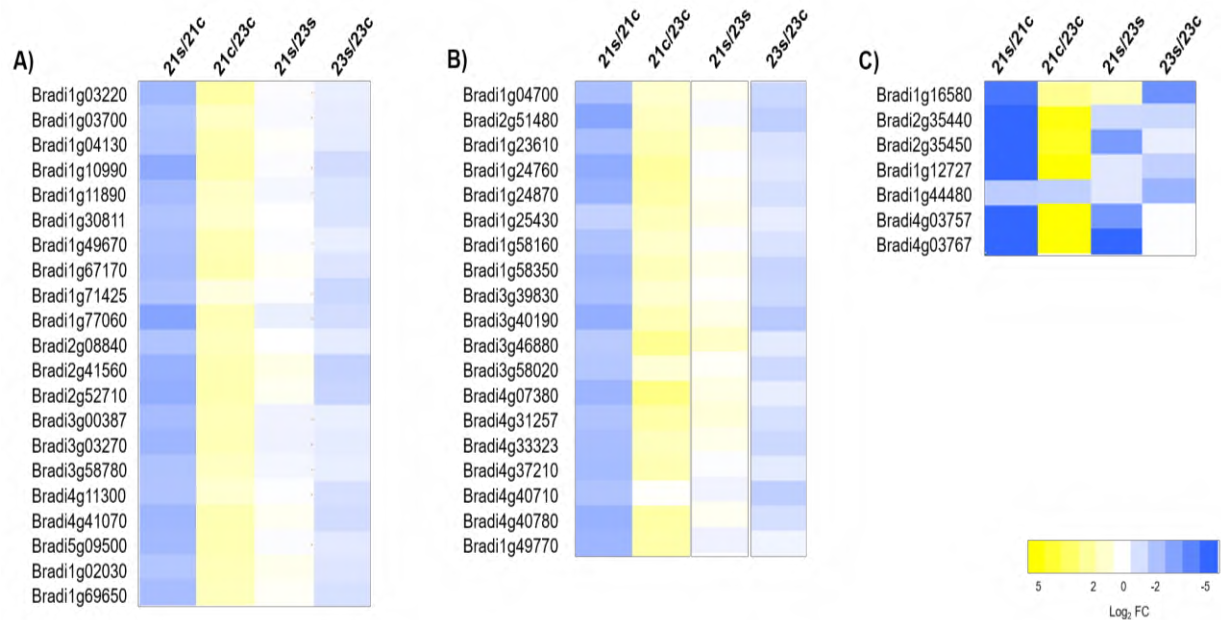
Los procesos de traducción (GO: 0006412) revelarían cambios en el estado del ribosoma a nivel de polisomas durante y después del estrés. Estudios del perfil ribosómico en semillas de *Arabidopsis* sometidas a hipoxia, demostraron que existe una regulación selectiva de los mRNA encargados de respuestas relacionadas al estrés, que existe una represión del nivel de polisomas durante el estrés y que se revierte en la reoxigenación (Branco-Price *et al.*, 2008; Juntawong *et al.*, 2013). Así, el manejo eficiente de la traducción de los genes de respuesta a estrés es fundamental para la supervivencia de las plantas en estrés e indica que Bd2-3 podría tener más unidades de traducción durante el estrés y aumentar la eficiencia de producción de las proteínas cruciales como la hemoglobina.

También se observó que los transcritos del ciclo de Calvin están regulados negativamente pero no están totalmente apagados, lo que reacla la importancia del manejo de las ERO derivadas de su actividad. El grupo de fotosíntesis (GO: 0015979) está reprimido en Bd21 y mostraría que Bd2-3 se encuentra preparado para afrontar el estrés generado por la ausencia de luz. La integridad de los mecanismos

fotosintéticos durante la inundación es crucial para la supervivencia de la planta, para obtener energía y almacenar carbohidratos (Fukao *et al.*, 2006).

El grupo de procesos metabólicos de lípidos (GO: 0006629) se encontró más reprimido en Bd21. Recientemente se comenzó a estudiar su importancia en plantas sometidas a estrés y su asociación con la integridad de la membrana y la captura de ERFs-VII en las membranas celulares en *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 2015). El factor de transcripción *SUB1A* de arroz también regula positivamente el almacenamiento y movilización de lípidos en plántulas de *Arabidopsis* (Peña-Castro *et al.*, 2011).

La expresión diferencial de estos tres grupos en los dos ecotipos, muestra que en Bd2-3 se apagan menos que en Bd21, y esto refuerza la hipótesis de que Bd2-3 se encuentra genéticamente preparado para mantener estos procesos cruciales y la síntesis de transcritos relevantes en la respuesta al estrés por inundación.



**Figura 23. Transcritos de los grupos de traducción de proteínas (A) fotosíntesis (B) y metabolismo de lípidos (C) regulados en *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.**

Se muestran valores Log<sub>2</sub>FC después de dos días de estrés. Todos los transcritos son significantes a FDR<0.05x10<sup>-5</sup> (Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5)

#### 7.4.4 Integración del ciclo de ácidos tricarboxílicos y el ciclo del glioxilato.

En las plantas, la eficiencia en la producción de ATP durante la glucólisis es fundamental para la tolerancia a hipoxia. Lo anterior se logra por las vías de fermentación del piruvato (Atwell *et al.*, 2015; Narsai *et al.*, 2015). Con la información anterior, se optó por reconstruir las rutas de glucólisis, piruvato, ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato.

Los transcritos en ambos ecotipos de *Brachypodium distachyon* indican una regulación positiva de estas rutas (Figura 23 y 25). Por ejemplo, las enzimas del ciclo del glioxilato *ISOCITRATE LYASE (ICL, Bradi1g25870)*, *CITRATE SYNTHASE (CSY, Bradi3g08910)*, *MALATE SYNTHASE (MLS, Bradi5g13940)*, *MALATE DEHYDROGENASE (MDH, Bradi1g07170, Bradi2g15740, Bradi3g37140, Bradi4g00910)* están reguladas positivamente, y permitirían trabajar en conjunto durante el estrés con el ciclo de Krebs reciclando acetil-CoA en isocitrato y evitar la pérdida de energía. Lo anterior ya se ha propuesto durante la germinación en semillas de arroz sometidas a estrés por inundación (Miro e Ismail, 2013). Lo que permite concluir que la activación simultánea de las vías del glioxilato y el ciclo de Krebs durante el estrés por hipoxia, son piezas clave para la generación de energía (Figura 25).

Las enzimas del ciclo de Krebs reguladas positivamente en ambos ecotipos son *PYRUVATE DECARBOXYLASE (PDC, Bradi2g03840, Bradi1g65440)*, *PYRUVATE DEHYDROGENASE (PDH, Bradi1g13777, Bradi4g44480)*, *CITRATE SYNTHASE (CS, Bradi3g06930)*, *ACONITATE HYDRATASE (ACN, Bradi1g75960, Bradi3g02487, Bradi3g15050)*, *ISOCITRATE DEHYDROGENASE (IDH, Bradi2g08700, Bradi2g45420)*, *SUCCINYL-CoA LIGASE (SDH, Bradi1g23600, Bradi3g49070)*, *SUCCINATE DEHYDROGENASE (SDH, Bradi1g07020, Bradi1g57930, Bradi3g13980)*, *FUMARATE HYDRATASE (FUM, Bradi1g63020)*, *MALATE DEHYDROGENASE (MDH, Bradi2g45200)*, *MALATE OXIDOREDUCTASE (ME, Bradi1g27000, Bradi2g05620, Bradi2g33450)*. Se muestra una regulación positiva en ambos ecotipos en los transcritos reguladores del ciclo del glutamato, actuando como

una vía de ahorro de energía convirtiendo el isocitrato a malato. Las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs se encuentran constitutivas en condiciones control y reguladas negativamente durante el estrés.

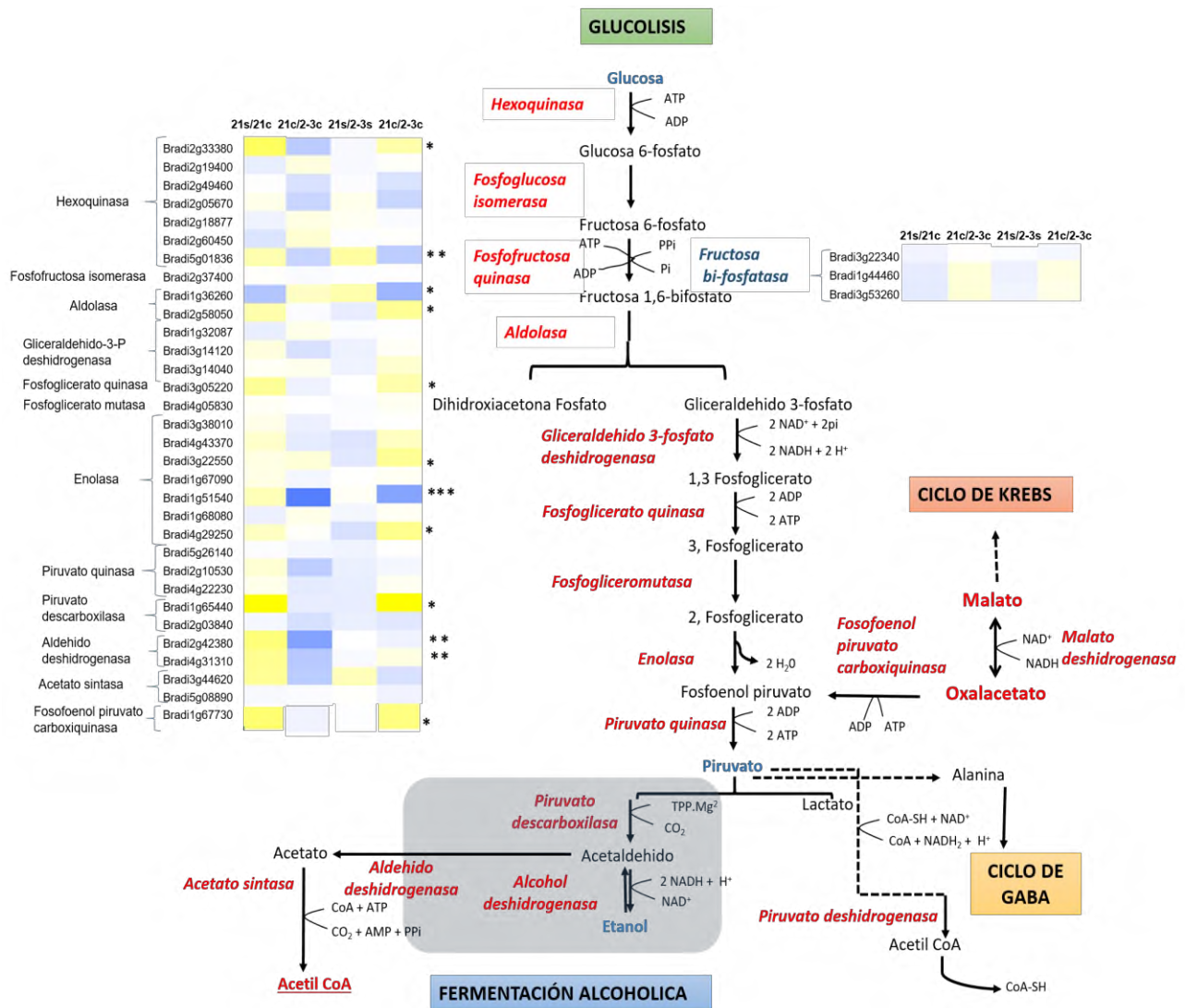
De las rutas de fermentación clásica, se encontraron regulados positivamente los transcritos de las enzimas de todas las rutas de uso de piruvato, pero no se encontraron regulados de forma diferencial, con la excepción de la fermentación a acetato a través de *ALDEHYDE DEHYDROGENASE (ALDH)*, Bradi2g42380, Bradi4g31310) y *ACETATE SINTASE (ACS)*, Bradi3g44620, Bradi5g08890). Esta ruta mostró mayor expresión en Bd2-3. Estas dos enzimas son importantes en el proceso de destoxicación de acetaldehído y proveerían de una ruta de reciclado de acetyl-CoA en conexión con el ciclo del glioxilato.

El manejo transcriptómico entre los ecotipos *Brachypodium distachyon* en las rutas comunes de respuesta al estrés por hipoxia es similar a lo descrito en otras plantas (Miro e Ismail, 2013; Atwell *et al.*, 2015; Narsai *et al.*, 2015). Sin embargo, las pequeñas diferencias detectadas (manejo de acetato y PPK) pueden ser otros factores de tolerancia y se deben analizar en un nivel bioquímico para dar seguimiento y reconstrucción de vías metabólicas.

Adicionalmente, el presente estudio transcriptómico es único en la literatura pues se generó bajo la influencia del ciclo de la luz y en un contexto de ciclos diurnos, lo que daría relevancia e integración de enzimas reguladores de mecanismos comunes, como determinantes para la tolerancia al estrés.

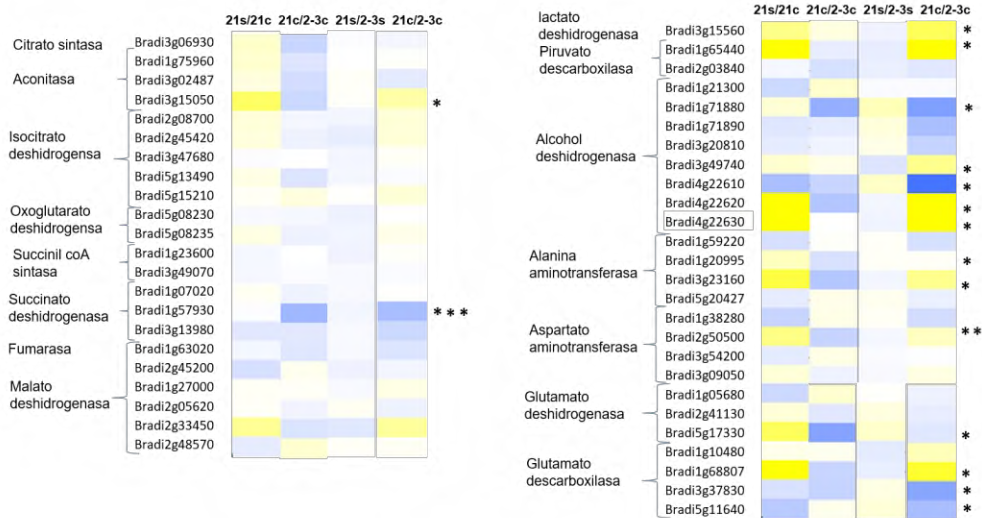
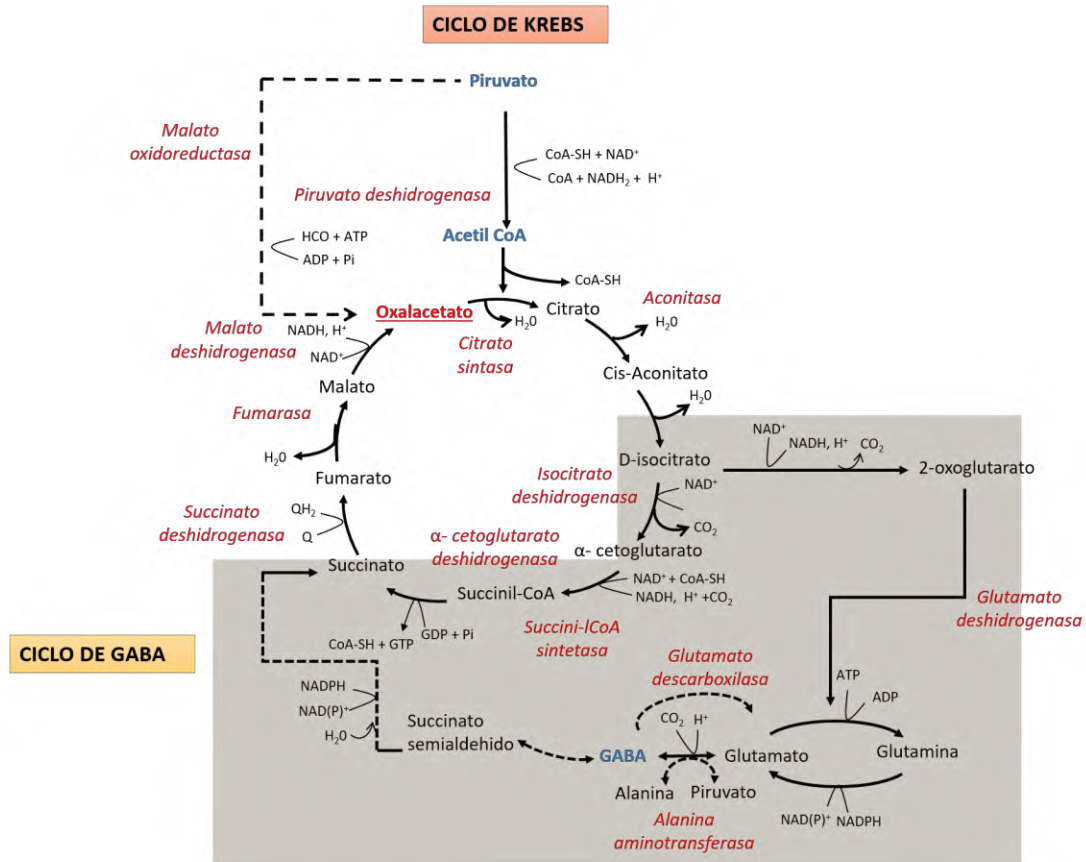
#### **7.4.5 Las rutas de floración durante el estrés por inundación.**

En los datos fisiológicos (Figura 26 A, C) se observó un retraso significativo en el inicio de floración en ambos ecotipos. El ecotipo Bd21 control floreció alrededor de los 26 d como se reportó previamente (Tabla 3, Schwartz *et al.*, 2010) y mostró atraso en el tiempo a floración en proporción al tiempo que permanecieron en inundación. Los individuos con mayor tiempo de estrés florecieron con un retraso de más de 10 d.



**Figura 24. Transcritos expresados en la glucólisis y fermentación en ambos ecotipos de *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.**

Se muestran valores Log<sub>2</sub>FC de dos días de estrés. FDR<0.05x10<sup>-5</sup> (Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5). ). \*Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd2-3, \*\*Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd21, \*\*\*Regulado significativa e inversamente en ambos ecotipos.



**Figura 25. Transcritos expresados en el ciclo de Krebs y GABA en ecotipos de *Brachypodium distachyon* en estrés por inundación.**

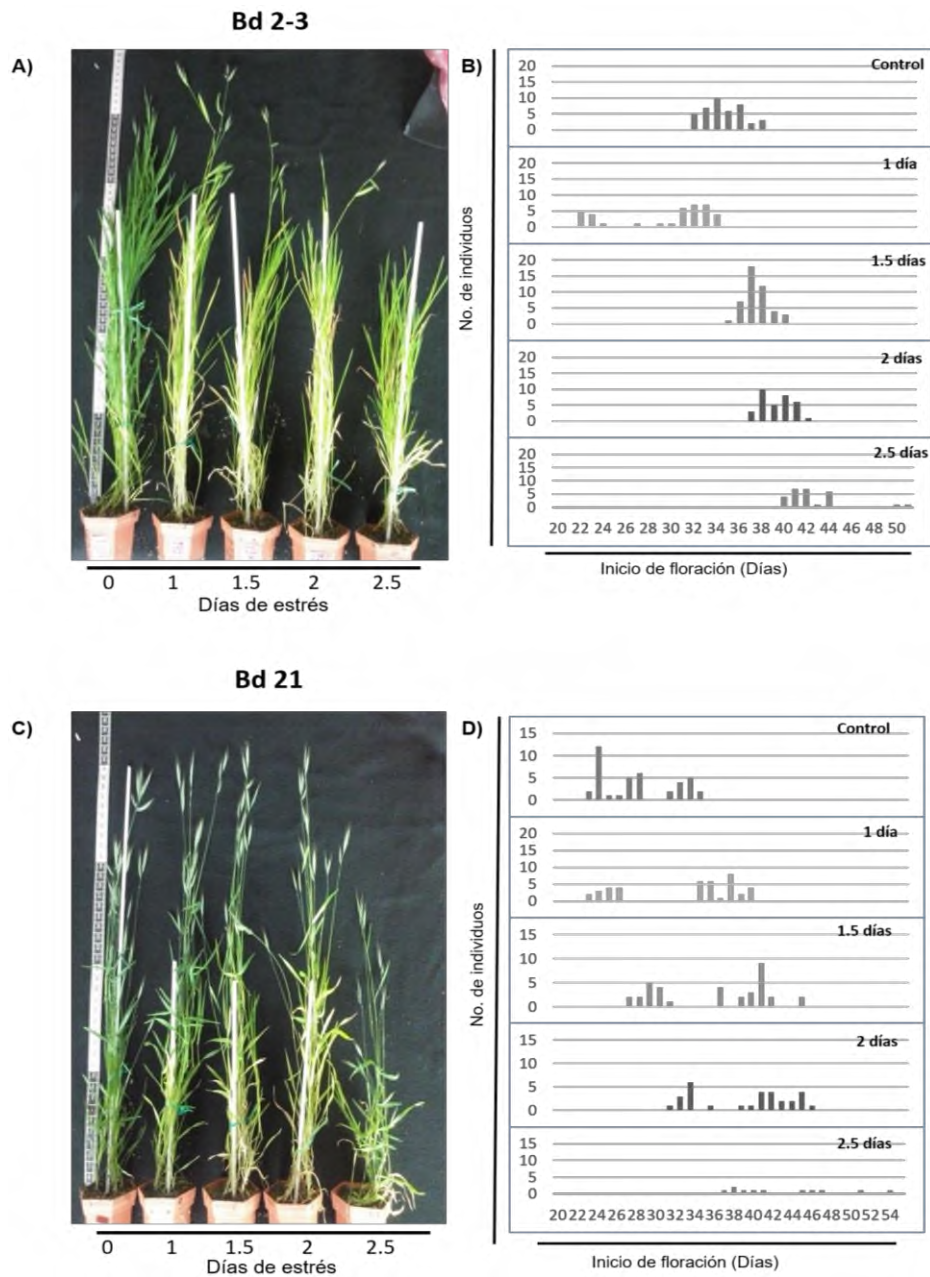
Se muestran valores  $\text{Log}_2\text{Fc}$  de dos días de estrés.  $\text{FDR} < 0.05 \times 10^{-5}$  ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$ ). \* Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd2-3, \*\* Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd21, \*\*\*Regulado significativa e inversamente en ambos ecotipos.

El ecotipo Bd2-3 tiene una floración reportada de 40 días aproximadamente (Schwartz *et al.*, 2010), conforme el estrés se hace más intenso, se muestra un retraso progresivo, en especial después de 2 d de estrés. La diferencia con Bd21, puede ser un reflejo de que este ecotipo tiene un tiempo a floración un poco mayor y por lo tanto la inhibición de genes de floración puede tener un impacto menor (Figura 26 B, D).

Esta respuesta es similar a la reportada en arroz tolerante y *Arabidopsis* con respecto al ERF-VII SUB1A donde se encontró a la floración reprimida a través de la regulación negativa de los genes clásicos de floración *CONSTANS* (*CO*) y *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Peña-Castro *et al.*, 2011). Lo anterior se propone como una acción temporal para el manejo de energía (Bailey-Serres *et al.*, 2015). En *Brachypodium* se determinaron previamente todos los homólogos de las rutas de floración (Higgins *et al.*, 2010) y se usó en este trabajo ese conocimiento para observar el comportamiento del transcriptoma de floración.

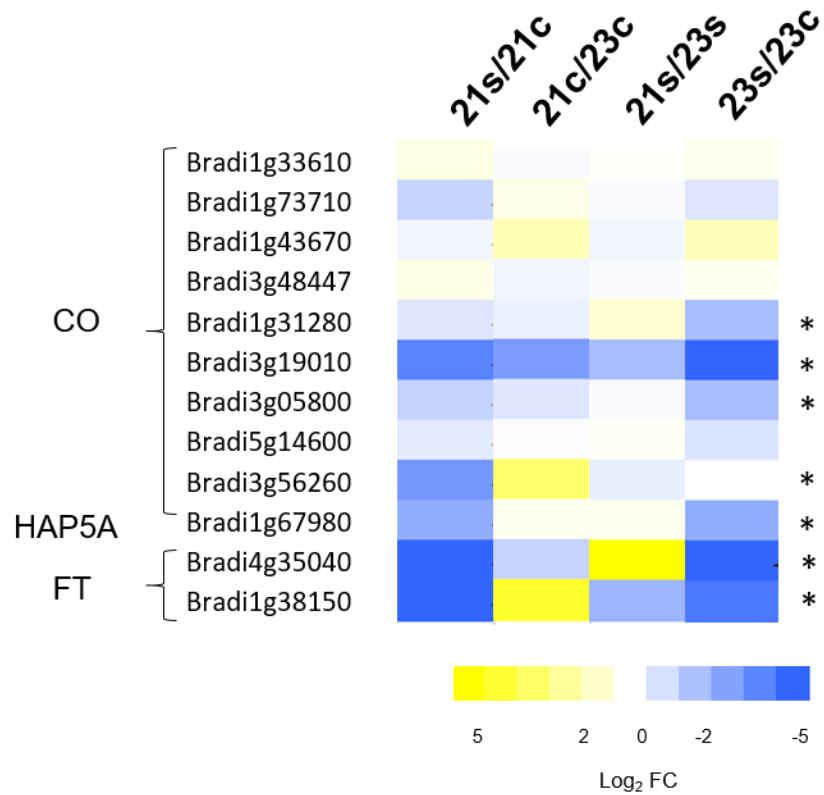
Se encontraron reprimidos los transcritos de *CO*, *FT* y dos transcritos de la familia HAP5A sin que hubiera diferencias entre los ecotipos Bd21 y Bd2-3 (Figura 27). Estos resultados concuerdan con los datos fisiológicos y lo reportado previamente para *Arabidopsis* y arroz.

A pesar de no observarse diferencias entre los ecotipos, es importante resaltar la importancia del conocimiento de los genes que inhiben la floración como una perspectiva de estudio en plantas con importancia económica, por ejemplo podríamos mantener esa característica para ayudar a que la floración se retrase hasta que las condiciones ambientales sean óptimas, lo que mejoraría la tolerancia y la recuperación de las plantas sometidas a varios tipos de estrés. Este conocimiento también se empleó para aumentar el contenido de almidón en *Arabidopsis* (Núñez-López *et al.*, 2015).



**Figura 26. Tiempo a floración de *Brachypodium distachyon*, ecotipos Bd2-3 y Bd21 después de un estrés por inundación.**

Plantas con 35 días de edad, sometidas a los 14 d a un estrés por inundación durante 1, 1.5, 2 y 2.5 d. Fotografías de Bd2-3 (A) y Bd21 (B). Histogramas de el día de inicio de floración (cuando aparece la primer espiga con respecto al número de individuos que florecieron ese día para Bd2-3 (B) y Bd21 (D).



**Figura 27. Transcritos encargados del proceso de floración en *Brachypodium distachyon*, ecotipos Bd21 y Bd2-3.**

Se muestran los valores Log<sub>2</sub>FC de dos días de estrés por inundación. FDR<0.05x10<sup>-5</sup> (Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5)\*. Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd2-3, \*\* Regulado significativamente hacia arriba o abajo en Bd21, \*\*\*Regulado significativa e inversamente en ambos ecotipos.

## 8. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los datos fisiológicos de supervivencia y de hojas sanas, se determinó al ecotipo Bd2-3 como tolerante y a Bd21 como sensible. Los ecotipos Tek10 y Bd1-1 podrían considerarse como tolerantes también, pero se deben estudiar por separado debido a que existen variaciones fisiológicas de la floración que comparten entre ellos pero no con Bd21 y Bd2-3.

Las plantas de *Brachypodium distachyon* ecotipos Bd21 y Bd2-3, al usarse como materiales genéticos contrastantes, permitieron observar la expresión de transcritos comunes de regulación durante la inundación, en especial aquellos relacionados con la homeostásis energética. También fue posible descubrir conjuntos diferenciales de expresión génica que pueden explicar la mayor tolerancia de Bd2-3, tal fue el caso de el grupo de óxido reducción donde se encontraron enzimas como *HB1* y *NR*, encargadas del manejo ROS. El análisis histológico demostró que los ecotipos tolerantes tienen efectivamente, un mejor manejo de ROS. Estos genes constituirían una ruta para la detoxificación de la planta en los procesos de respuesta y recuperación post-inundación.

La secuenciación por RNA-Seq también mostró que existen grupos con patrones de regulación donde Bd2-3 muestra una transcripción constitutiva, mientras que Bd21 la induce durante el estrés. Tal es el caso de síntesis de aminoácidos, manejo de acetato, inducción de *PPDK* y respuesta a patógenos.

La principal conclusión de este trabajo es que la tolerancia diferencial de los ecotipos de *Brachypodium distachyon* estudiados, está determinada por mecanismos constitutivamente preparados para afrontar los efectos negativos del estrés por inundación que requieren un gasto energético, como el estrés oxidativo, y que en condiciones de estrés disminuyen los recursos de la planta.

## 9. PERSPECTIVAS.

En el caso de *Brachypodium distachyon* se debe abordar el estudio de la tolerancia al estrés por inundación desde un punto de vista bioquímico. De acuerdo a los resultados obtenidos existen diferencias de transcripción en enzimas reguladoras de rutas metabólicas relevantes, por ejemplo, la glucólisis, fermentación, ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato, y no de forma masiva en genes del núcleo central.

Desde esta perspectiva, se propone abordar el estudio de aquellas enzimas reguladoras de las vías alternas de producción de energía durante el estrés por inundación y de manejo de estrés oxidativo durante y después del estrés. Se podría iniciar desde el estudio de estas enzimas en construcciones sobreexpresantes o de silenciamiento, incluso con la manipulación de su expresión en tejidos y células.

Se pueden explorar con herramientas bioinformáticas la expresión de los genes desconocidos que se encontraron expresados diferencial o constitutivamente en las condiciones contrastantes de los ecotipos, ya que en ellos se pueden encontrar funciones clave. Una vez seleccionados se podrían insertar o silenciar en plantas transgénicas para determinar sus funciones.

Pueden explorarse genes que se expresaron de forma diferencial, en especial los que son constitutivos en el ecotipo tolerante pero inducibles en el sensible. Los datos indican que parecen ser las claves en el fenotipo contraste de tolerancia y el desarrollo de estrategias diferenciales. Una alternativa sería usar plantas transgénicas sobre expresantes o editadas con las nuevas tecnologías (ej. Cas9) para determinar su potencial biotecnológico en el mejoramiento vegetal de la tolerancia a la inundación. Los genes *HAEMOGLOBIN 1* y *NITRATE REDUCTASE* constituyen excelentes candidatos para un estudio de continuación.

## 10. REFERENCIAS.

1. **2000agro. 2013.** Huracanes dejan más de 534 mil hectáreas afectadas: SAGARPA. Consultado en línea : <http://www.2000agro.com.mx/agroindustria/huracanes-dejan-mas-de-534-mil-hectareas-afectadas-sagarpa/>
2. **Agroasemex. 2011.** La experiencia mexicana en el desarrollo y operación de seguros paramétricos orientados a la agricultura. Consultado en línea: <http://www.agroasemex.gob.mx/index.php/es/actualizate2/informacionmeteorologica>. México. 66p.
3. **Altieri MA, Nicholls CI. 2009.** Cambio climático y agricultura campesina: impactos y respuestas adaptativas. *Revista de Agroecología* 93: 1-24 p.
4. **Anders S, Pyl PT, Huber W. 2016.** HT-seq a python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 33: 166-169.
5. **Atwell BJ, Greenway H, Colmer TD. 2015.** Efficient use of energy in anoxia-tolerant plants with focus on germinating rice seedlings. *New Phytologist* 206: 36-56.
6. **Bahar O, Pruitt R, Luu D, Schewessinger B, Daudi A, Liu F, Ruan R, Fontaine-Bodin L, Koebnik R, Ronald P. 2014.** The *Xanthomonas* Ax21 protein is processed by the general secretory system and is secreted in association with outer membrane vesicles. *PeerJ* 2: e242.
7. **Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs D, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voeselek LACJ, Van Dongen JT. 2012.** Making sense of low oxygen sensing. *Trends in Plant Science* 17:1360-1385.
8. **Bailey-Serres J, Lee SC, Brinton E. 2012.** Waterproofing crops: effective flooding Survival Strategies. *Plant Physiology*. 160: 1698-1709.
9. **Bailey-Serres J, Voeselek LACJ. 2008.** Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* 59: 313-339.

10. **Bailey-Serres J, Voeselek LACJ. 2010.** Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 1-6.
11. **Banti V, Giuntoli B. 2013.** Low Oxygen Response Mechanisms in Green Organisms. *International Journal of Molecular Science* 14: 4734-4761.
12. **Barding GA, Béni S, Fukao T, Bailey-Serres J, Larive CK. 2013.** Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research* 12: 898-909.
13. **Bello V. 2013.** SAGARPA reporta 10 mil hectáreas de cultivo dañadas en la entidad. *Periódico El Cambio*. Consultado en línea: <http://www.diariocambio.com.mx/2013/secciones/zoon-olitikon/item/31306-sagarpa-reporta-10-mil-hectareas-de-cultivo-danadas-en-la-entidad>. México.
14. **Bevan M, Garvin D, Vogel J. 2010.** *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 211-217.
15. **Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014.** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
16. **Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJH, Larive CK, Bailey-Serres J. 2008.** Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56: 743-755.
17. **Brutnell TP, Bennetzen JL, Vogel JP. 2015.** *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: Model genetic systems for the grasses. *Annual Review of Plant Biology* 66: 20.1-20.21.
18. **Campbell MT, Proctor CA, Dou Y, Schmitz AJ, Phansak P, Kruger GR, Zhang C, Walia H. 2015.** Genetic and molecular characterization of submergence response identifies Subtol6 as mayor submergence tolerance locus in maize. *PLOS One* 10: e0120385.
19. **Chaudhary B. 2013.** Plant domestication and resistance to herbivory. *International Journal of Plant Genomics* 572784: 14.

20. **CNDH. 2011.** Los Derechos Humanos y el Cambio Climático. *Información relativa a la Resolución 7/23 del Consejo de Derechos Humanos*. México. 2p.
21. **CONAGUA. 2014.** Consultado en línea: <http://smn.cna.gob.mx/glosario/glos-c.html#ciclón2>
22. **Curtis S, Barnes M. 2007.** Biología de Curtis. Ed. Panamericana. 7ma. Edición. 422 p.
23. **Draper J, Mur LJA, Jenkins G, Biwash G, Bablak P, Hasterok R, Routledge A. 2001.** Brachypodium distachyon a new model system for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiology* 127: 1539-1555.
24. **Figueroa H, Briseño P, Aguilar R. 2013.** Huracán Ingrid y tormenta Manuel inundan al país. *Periódico El Excelsior*. Consultado en línea: <http://www.excelsior.com.mx/nacional/2013/09/16/918810>.
25. **Fontaine JX, Tercé-Laforgue T, Armengaud P, Clément G, Renou JP, Pelletier S, Catterou M, Azzopardi M, Gibon Y, Lea PJ, Hirel B, Dubois F. 2012.** Characterization of NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis thaliana* demonstrates the key role of this enzyme in root carbón and nitrogen metabolism. *The Plant Cell* 24: 4044-4065.
26. **Fukao T, Bailey-Serres J. 2008.** Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of National Academy of Science of the United states of America* 105: 16814-16819.
27. **Fukao T, Harris T, Bailey-Serres J. 2008.** Evolutionary analysis of the Sub1 gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice. *Annals of Botany* 103: 143-150.
28. **Fukao T, Xiong L. 2013.** Genetic mechanisms conferring adaptation to submergence and drought in rice: simple or complex?. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 196-204.
29. **Fukao T, Xu K, Ronald P, Bailey-Serres J. 2006.** A Variable Cluster of Ethylene Response Factor–Like Genes Regulates Metabolic and

- Developmental Acclimation Responses to Submergence in Rice. *The Plant Cell* 18: 2021–2034.
30. **Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J. 2011.** The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. *The Plant Cell* 23: 412-427.
  31. **Gibbs DJ, Conde JV, Berckhan S, Prasad G, Mendiando G, Holdsworth MJ. 2015.** Group VII Ethylene Response Factors coordinate oxygen and nitric oxide signal transduction and stress responses in plants.
  32. **Gibbs DJ, Isa NMD, Movahedi M, Lozano-Juste J, Mendiando GM, Berckhan S, Marín-de la Rosa N, Vicente CJ, Sousa CC, Pearce SP, Bassel WG, Hamali B, Talloji P, Tomé DFA, Coego A, Beynon J, Alabadí D, Bachmair A, León J, Gray JE, Theodoulou FL, Holdsworth MJ. 2014.** Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Molecular Cell* 53: 369-379. *Plant Physiology* 169: 23-31.
  33. **Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rockhsar DS. 2010.** The international Brachypodium initiative (IBI). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763-768.
  34. **Gutiérrez Bonilla LA, Montfort Guillén F, López Flores E. 2006.** Impacto económico en el sector agrícola. En: *Inundaciones 2005 en el estado de Veracruz*. Eds: Tejeda Martínez A., Welsh Rodríguez C, Universidad Veracruzana, p. 135-158.
  35. **Hansberg TW. 2002.** Biología de las especies de oxígeno reactivas. Universidad Nacional Autónoma de México. *Mensaje Bioquímico* XXVI: 36.
  36. **Hattori YK, Nagai S, Furukawa XJ, Song R, Kawano H, Sakakibara J, Wu T, Matsumoto A, Yoshimura H, Kitano M, Matsuoka H, Mori H, Ashikari M. 2009.** The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026-1030.

37. **Higgins JA, Bailey PC, Laurie DA. 2010.** Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate grasses. *PLOS One* 5: e10065.
38. **Hildebrandt T, Nunes A, Araújo W. 2015.** Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plants* 8: 1563-1579.
39. **Hill RD. 2012.** Non-symbiotic haemoglobins—What's happening beyond nitric oxide scavenging?. *AoB Plants* 2012: pls004.
40. **Hong SY, Park JH, Cho SH, Yang MS, Park CM. 2011.** Phenological growth stages of *Brachypodium distachyon*: codification and description. *Weed Research* 51: 612-620.
41. **Hung T, Kuo K, Ching H. 2004.** Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid induced senescence of rice leaves. *Journal of Plant Physiology* 161: 1347-1357.
42. **Hwan HJ, Lee OM, Choy HY, Ha-Lee YM, Bong Hong C, Lee DH. 2011.** Expression Profile Analysis of Hypoxia Responses in Arabidopsis Roots and Shoots. *Journal of Plant Biology* 54: 373-383.
43. **Igamberdiev AU, Seregelyes C, Manac'h N, Hill DR. 2004.** NADH dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta* 219: 95-102.
44. **Juntawong P, Sirikhachornkit A, Pimjan R, Sonthirod C, Sangsrakru D, Yoocha T, Tangphatsornruang S, Srinives P. 2013.** Elucidation of the molecular responses to waterlogging in *Jatropha* roots by transcriptome profiling. *Frontiers in Plant Science* 5: 658.
45. **Kline KG, Sussman MR, Jones AM. 2010.** Abscisic acid receptors. *Plant Physiology*. 154: 479-482.
46. **Kretzchmar T, Pelayo MAF, Trijatmiko KR, Franz L, Gabunada M, Alam R, Jimenez R, Mendiolo MS, Slamet-Loedin IH, Sreenivasulu N, Bailey-Serres J, Ismail AM, Mackill DJ, Septiningsih M. 2015.** A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice. *Nature Plants* 1: 15124.

47. **Lee SC, Mustroph A, Sasidharan R, Vashisht D, Pedersen O, Oosumi T, Voeselek LA, Bailey-Serres J. 2011.** Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytologist* 190: 457-471.
48. **Licausi F, Kosmacz M, Weits DA. 2011.** Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479: 419-422.
49. **Licausi F, van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P, Perata P. 2010.** HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 62: 302-315.
50. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P. 2011.** Biología celular y molecular. Ed. Panamericana. 1054 p.
51. **Luo N, Liu J, Xu J, Jiang Y. 2011.** Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 141: 19-29.
52. **Manson RH, Jardel EJ. 2009.** Perturbaciones y desastres naturales: impactos sobre las ecorregiones, la biodiversidad y el bienestar socioeconómico. Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. *CONABIO*. México. 131-184 p.
53. **Mendiondo GM, Gibbs DJ, Szuman-Zubrzycka M, Korn A, Marquez J, Szarejko I, Maluszynski M, King J, Axcell B, Smart K, Corbineau F, Holdsworth MJ. 2015.** Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnology Journal*. 14: 40-50.
54. **Miro B, Ismail AM. 2013.** Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science* 4: 269.
55. **Miyakawa T, Hatano K-I, Miyauchi Y, Suwa Y-I, Sawano, Tanokura M. 2014.** A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity. *Plant Physiology* 166: 766-778.

56. **Mustroph A, Bailey-Serres J. 2010.** The Arabidopsis transcriptome cell-specific mRNA atlas: Mining suberin and cutin lipid monomer biosynthesis genes as an example for data application. *Plant signaling & Behavior*. 5:1-5.
57. **Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJ, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW. 2009.** Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science* 106: 188-193.
58. **National hurricane center (NHC). 2013.** Hurricane seasons date. Consultado en línea: <http://www.nhc.noaa.gov/index.shtml?epac>
59. **Narsai R, Whelan J. 2015.** How unique is the low oxygen response? An analysis of the anaerobic response during germination and comparison with abiotic stress in rice and Arabidopsis. *Frontiers in plant science* 4: 349.
60. **Navarro M. 2014.** Sagarpa cuantifica mil 680 hectáreas de cultivo afectadas por lluvias en Nayarit. *La Jornada en línea*. <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2014/11/11/sagarpa-cuantifica-mil-680-hectareas-de-cultivo-afectadas-por-lluvias-1428.html>
61. **Núñez-López L, Aguirre-Cruz A, Barrera-Figueroa, BE, Peña-Castro, JM. 2015.** Improvement of enzymatic saccharification yield in Arabidopsis thaliana by ectopic expression of the rice SUB1A-1 transcription factor. *PeerJ* 3: e817.
62. **Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH. 2008.** *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends in Plant Science* 13: 172-177.
63. **Ortiz A, Chang HC, Bush DR. 2000.** Amino acid transporters in plants. *Biochimica and Biophysical Acta* 1465: 275-280.
64. **Pratelli R, Pilot G. 2014.** Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 65: 5535–5556.
65. **Peña-Castro JM, Barrera-Figueroa BE, Fernández-Linares L, Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B. 2006.** Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. *Plant Science* 170: 724-731.

66. **Peña-Castro JM, van Zanten M, Lee SC, Patel MR, Fukao T, Voesenek LACJ, Bailey-Serres J. 2011.** Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence-tolerance mechanism. *The Plant Journal* 67: 434–446.
67. **Perata P, Voesenek LACJ. 2007.** Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends in Plant Science* 12: 43-26.
68. **Pérez SC. 2014.** Los cabos, el municipio más afectado por el huracán “Odile”. *La jornada en línea*.  
<http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2014/09/15/los-cabos-el-municipio-mas-afectado-por-el-huracan-odile-proteccion-civil-2611.html>
69. **Phytozome: a comparative platform for Green plant genomics. 2011.** doi: 10.1093/nar/gkr944PMCID. [www.Phytozome.Jgi.Doe.gov](http://www.Phytozome.Jgi.Doe.gov)
70. **Rascio N, Navari-Izzo F. 2010.** Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science* 180: 169-81.
71. **Schwartz CJ, Doyle MR, Manzaneda AJ, Rey PJ, Mitchell-Olds T, Amasino RM. 2010.** Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenergy Research* 3: 38-46.
72. **Septiningsih EM, Pamplona AM, Sanchez DL, Neeraja CN, Vergara GV, Heuer S, Ismail AM, Mackill DJ. 2009.** Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond. *Annals of Botany*. 103: 151–160.
73. **Setter TL, Waters I, Sharma SK, Singh KN, Kulshreshtha N, Yaduvanshi NPS, Ram PC, Singh BN, Rane J, McDonald G, Khabaz-Saberi H, Biddulph TB, Wilson R, Barclay I, McLean R, Cakir M. 2009.** Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India: the importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. *Annals of botany* 103: 221-235.
74. **Shiono K, Yamada S. 2014.** Waterlogging tolerance and capacity for oxygen transport in *Brachypodium distachyon* (Bd21). *Plant Root* 8: 5-12.

75. **Singh US, Dar MH, Singh S, Zaidi NW, Bari MA, Mackill DJ, Collar BCY, Singh VN, Singh JP, Reddy JN, Singh RK, Ismail AM. 2013.** Field performance, dissemination, impact and tracking of submergence tolerant (Sub1) rice varieties in South Asia. *SABRAO Journal of breeding and genetics* 45: 112-131.
76. **Singh S, Mackill DJ, Ismail AM. 2009.** Responses of SUB1 rice introgression lines to submergence in the field: yield and grain quality. *Field Crops Research* 113: 12-23.
77. **Sorenson R, Bailey-Serres J. 2013.** Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 2373–2378.
78. **Taiz L, Zeiger E. 2006.** Fisiología Vegetal. Ed. Universitat Jaume. 1338 p.
79. **Valla JJ. 2007.** Botanica. Morfología de las plantas superiores. 1ª ed. Ed. Hemisferio sur. 352 p.
80. **Van Dongen JT, Licausi F. 2015.** Oxygen sensing and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 66: 345-67.
81. **Vanlerberghe GC. 2013.** Alternative oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Science* 14: 6805-6847.
82. **van Veen H, Melis A, Jamar DCL, Vreugdenhil D, Kooiker M, van Tiender P, Voeselek LACJ, Schranz ME, Sasidharan R. 2014.** Group VII Ethylene Response Factor diversification and regulation in four species from flood-prone environments. *Plant Cell and Environment* 37: 2421-2432.
83. **van Veen H, Mustroph A, Barding GA, Eijk M, Welschen RAM, Persen O, Visser EJW, Bailey-Serres J, Voeselek LACJ, Sasidharan R. 2013.** Two Rumex species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *Plant Cell* 25: 4691–4707.
84. **van Veen H, Vashisht D, Akman M, Girke T, Mustroph A, Reinen E, Hartman S, Kooiker M, Van Tienderen P, Schranz M, Bailey-Serres J,**

- Voeselek L ACJ, Sasidharan R. 2016.** Transcriptomes of eight *Arabidopsis thaliana* accessions reveal core conserved, genotype- and organ-specific responses to flooding stress. *Plant Physiology* 172: 668-689.
85. **Voeselek LACJ, Bailey-Serres J. 2015.** Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist* 206: 57-73
86. **Vogel J, Garvin D, Mockler TC, Schmutz J, Rokhsar D. 2010.** Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763-768.
87. **Wang K, Li H, Ecker J. 2002.** Ethylene Biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* 14: 131–151.
88. **Watson L, Macfarlane TD, Dallwitz MJ. 2008.** The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. Consultado en línea: <http://delta-intkey.com/grass/#B>
89. **Watts RA, Hunt PW, Hvitved AN, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES. 2001.** A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 10119-10124.
90. **Wrzaczek M, Brosché M, Salojärvi J, Kangasjärvi S, Idänheimo N, Mersmann S, Robotze S, Karpiński S, Karpińska B, Kangasjärvi J. 2010.** Research article Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of Receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 10: 95.
91. **Xie LJ, Yu LJ, Chen QF, Wang FZ, Huang L, Xia FN, Zhu TR, Wu JX, Yin J, Liao B, Shu W, Xiao S. 2015.** *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein ACBP3 participates in plant response to hypoxia by modulating very-long-chain fatty acid metabolism. *The Plant Journal* 81: 53-67.
92. **Xu K, Ismail AM, Ronald P. 2014.** Flood tolerance mediated by the rice Sub1A transcription factor. Segunda edición (Eds. Jenks MA, Hasewaga PM.

Jhon Wyle & Sons, Inc, Hoboken, NJ. Blackwell. doi: 10.1002/9781118764374. ch1.

93. **Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. 2006.** Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705–708.
94. **Zamora Hernandez T. 2015.** Identificación y estudio de la expresión de los Factores de Respuesta al Etileno del Grupo VII en *Brachypodium distachyon* que participan en la respuesta al estrés por inundación. Tesis licenciatura. Universidad del Papaloapan, Laboratorio de Biotecnología Vegetal.
95. **Zhang J, Díaz A, Mao L, Ahiquist P, Wang X. 2012.** Host Acyl Coenzyme A binding protein regulates replication complex assembly and activity of a positive-strand RNA virus. *Journal of Virology* 86: 5110-5121.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1

- **ddH<sub>2</sub>O**

Se utilizó agua destilada y desionizada (B-Pure Barnstead, Thermo Scientific). Se esterilizó a 121 °C durante 15 min a 15 psi. Se pasó por filtros de 0.20µm y se trató con luz UV durante 10 min (UV-HL-2000, UVP).

- **ddH<sub>2</sub>O DEPC**

Se adiciona 1 ml de DEPC a 1000 ml de ddH<sub>2</sub>O y se mantiene en agitación durante 24 h, posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 min a 15 psi para inactivar el DEPC.

- **MOPS 10X pH. 7.**

Se disuelven 5.44 g de acetato de sodio en 370 ml de ddH<sub>2</sub>O con DEPC. Se adicionan 20.60 g de MOPS y en agitación se agregan 10 ml de EDTA 10.5 M pH. 8. Se ajusta el pH. a 7.0 con NaOH 2 N y se afora a 50 ml con ddH<sub>2</sub>O DEPC. Para preparar MOPS 1X se toman 25 ml de MOPS 10X y se mezclan con 225 ml de ddH<sub>2</sub>O DEPC.

- **TAE 50X**

Se disuelven 242 g de TRIS en 100 ml de EDTA 0.5 M y 57.1 ml de ácido acético en ddH<sub>2</sub>O, se afora a 1 L y se verifica el pH a 8.0. Para preparar 100 ml de TAE 1X se toman 2 ml de TAE 50 X y se mezclan con 98 ml de ddH<sub>2</sub>O.

## Anexo 2

- **Gel Agarosa desnaturalizante 1%**

Para visualizar las muestras de RNA se utilizó gel de agarosa al 1%, preparado de la siguiente forma:

H <sub>2</sub> O DEPC	72 ml
MOPS 10X	10 ml
Agarosa	1 gr.
Formaldehido	18 ml.

Se pesó y fundió 1 gr de agarosa en los 72 ml de H<sub>2</sub>O DEPC, se agrega el MOPS 10X y en campana de extracción el formaldehido. También en campana de extracción se mezcla y vacia en el molde para gel. Se corre con MOPS 1X.

- **Gel Agarosa 2%**

Se fundieron 2 gr. de agarosa en 100 ml de TAE1X, se vació en el molde para gel.

Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder plus 6X (SM1331, Thermo Scientific), que se preparó con 3 µl marcador + 9 µl ddH<sub>2</sub>O. Se cargó en el gel, usando como buffer a TAE 1X.

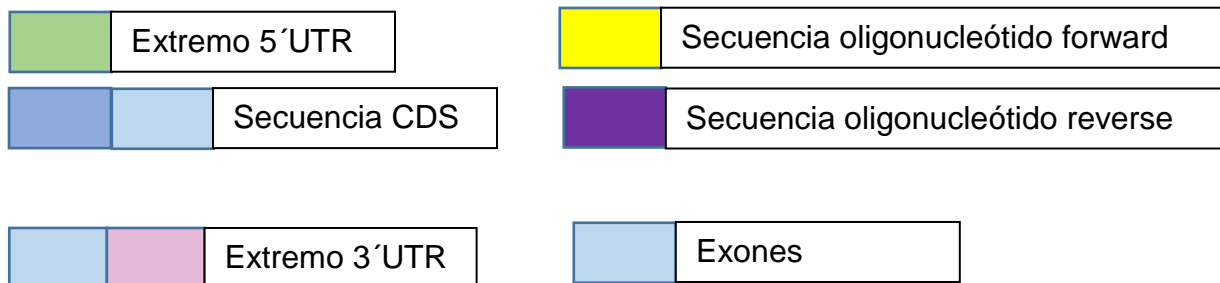
- **Preparación de muestra RNA para visualizar en gel 1%**

En tubos de 1.5 ml se agregan 2 µl de ddH<sub>2</sub>O DEPC, 1 µl de buffer de carga 5X (contiene bromuro de etidio y formaldehido), 2µl de RNA. Se homogenizó por vortex y se centrifugó durante algunos segundos a 4 °C. Se incubó a 65°C durante 5 min en un bloque de calentamiento y al finalizar se colocó en hielo durante 5 min, se centrifugó durante unos segundos a 4°C.

### Anexo 3

- Secuencias de los genes de *Brachypodium distachyon* utilizados para el diseño de oligonucleótidos

Simbología:



### Bradi1g69320 (Hemoglobina)

```
TCAAATCACGGCCAATTACTCGGTGACCAGTGTTCGTCTCACTTACACTGTTACACAGTTGAAGCAAGCGAGAAC
GAAGCTTAGCCATGTCTGTGAGGGAAGCGGCGCTCAGGAGGAGCCGTCGCCGGCTTCAGCGAGGAGAAGGAAGC
GCTGGTGCTCAAGTCATGGGCCATCATGAAGAAGGACTCCGCCAACCTTGGGCTCCGCTTCTTCTGAAGATCTTT
GAGATTGCGCCATCGGCCAAGGAGCTGTTCCGTTCTCTGCGCAACTCCGACGCGCCCTGGAAACCAACCCCAAGC
TCAAGACCCACGCCGTGTCTTTATCATGACGTGCGAGGCGGCTGCGCAGCTTCGAAAGCCGGCAAGATCAC
CGTGAGGGAGACCACCTGAAGAGTTGGGGGACGCACGTAAAATACGGCGTGGCAGATGGACACTTCGAGGTG
ACAAGATTTGCTCTGCTTGAGACGATAAAGGAGGCACTTCCGGCTGACATGTGGAGCCCGGAGATGAAGAACGCGT
GGGGCGAAGCCTATGACCAACTGGTCGCGGCCATCAAGCAAGAGATGAAGCCATCTGCGTAGCTCCATTGTTTTTC
TTTTCGAGGAAGCGTGGCTCCATTGTTCACTGCATGTCTGCATGCATTTTCGTCATTACCATGATGATCCGTGTC
CAACCTTTGTTCTGTACCACTGTGCTGCATTTATCACGTTGCCGAAGAAAAAAGAAAGCTAGAGTGTTTAT
TGTGTGTAAGTAATGCGTGCCTGTTGTGATAAATCGTGCTCACTTAATAATGATCTAGCGATTGATCCCAAAGAA
CAGACTGCTCATGAGGTTGCTCAAGAGATTATTTTTTTTCGAAAAAGAGGGAAGCACTATTCAAGTTCAAGTTCA
ACTAATTCA
```

## Bradi5g20547 (*Oxidasa alternativa*)

ATATCCATTGCCAGATCAACAATTTCAACACCAAGACAAGCCAGCAGCTGCTTGACCTTCCACGCCGCCAACAGAA  
CACATAACCGTAGACTTCCCATCCGATCCCGATCAACAAACATTCCGGTTAATCAGTTTGATCACGCCATGAGCTC  
TCGCATGGCCGGAGCCACGCTTCTCCGCCACCTGGCCCCCGCCTCGTCGCCGCCGGAGCCGGCGTCCGGGCTC  
GCCGCGAGGAGCATCATGCCCGCGGCCAGGATTTTCCCCGCCGGATGGCAAGCACAGCCGCCGCCCGGATG  
TCCAAGAAGGCGCCGCCGGCGCCACTGGAAAGACCGAGGGCCAGAGCAAGACCAAGGCCGTGGTCAGCTACTGGGG  
CATCGAGCCACGGAAGCTCGTCAAGGCGGACGGCACCGAGTGGCCGTGGTTCTGCTTCAGGCCGTGGGACACGTAC  
ACGGCGGACACGGCGATCGACATGCAGAAGCACACGAGCCCAAGTCCCTGCCGACAAGATCGCGTATTACACCG  
TCAAAACCTCGGTGTCCCAAGGACCTCTTCTCCAGCGCCGGCACGCGAGCCACGATTGCTGCTGAAACAGT  
AGCCGCCGTCCCTCCCATGGTGGGCGGCATGCTTCTCACTTACGCTCGCTCCGGCGCTTCGAGCACAGCGGCGGC  
TGGATCCGGGCGCTCATGGAAGAAGCCGAGAACGAGCGGATGCACCTCATGACATTCTCGAGGTGACGCAGCCCA  
AGTGGTGGGAGCGCGCTCGTGATGGCCGTCCAGGAGTCTTCTCAACGCCTACTTCGTGGATACCTGGTTTC  
CCCCAAGTTCGCGCACAGGTTTCGTCCGGTACCTTGAAAGAGAGGCCGTGAAGTCTTATACCGAGTACCTTAAGGAC  
CTGGAGGCTGGGAAGATCGAGAACACCCCGCGCCGGCCATTGCCATCGACTACTGGCGCCTCCCCGAGATGCTA  
CGCTCAAGGACGTCGTCGCCGTCTCCGCGCCGACGAGGCCATCACCGCGACGCCAACCACTACGCCTCGGACAT  
CCATTACCAGGGATTGACGCTCAAGGAGACGCCTGCCCGATCGGGTACCCTGATCTCAAATGGACGGTCGATGC  
CTGCTCATTTACCACACGTGCTGCTGCGGCCGCCACCAATCTTAGGCCTCTGTTCCGGGATAAATTGTTCCGCGTG  
CACTATATATGTTTATGTAAGTGAATCACGTCTTGTCACTTGGTTAATTTTCGAGTATGTTTGTAAACGCATGTAA  
ATATGATAAGATTACTCGCTAATAAGTAATAAGAAAGTCTAATATGCATGCATACCGTTTACCAGGAAAGCTT

## Bradi2g35450 (Lipasa)

ACAGATATATCGTGTCTTGAGCATTGATCAAATATTGTTCACTCACAATTTACAAAACACAAGTTAATTTGGAAAT  
GGTGGCCGTGGCGGCTGGTGGTCGTGAGAAGATGGGCATGAGAAGCTGATCATCAGGCGAGAGAAGGTGAGGCTC  
ATCGACATCCTGTGATGCTGCTCCTGCGGCGGCCGCTACCCAGCTACGCCTTCGTGACGCCAGCGACCAGACGG  
CGCGCGACCTCGGCGACGCGCCGGCCGGCTTCTCTTCGCGCTCGGCCAGTTCATCGTGTATCTCCTCGGCAAAGC  
CTACTACCCGGCCACGCTCATCGGCGCCGCCCTCGAGTTCCTCTTCAATCTCGTCGCGCTCAACGGCGGCTTGCTC  
GGCATAGTATGGAACACCTTCAGATGCAGGCTGGTGTATCCCGAACCGAGAGGCCCAACTACCGGACCATGACGA  
AGATGATCGACGGGAGAACGGAGCTGAGGCCGACATCGCCAGGGTTCGCCTCTGACGGGTGCCTGTGCGGGCTAAA  
TTTCTCAACGCCGCCAGTCTATTTGGCGAGGCTGCAGACCTCGAGAGCGGGGCTCGCTGCTGCACAGGCAGCG  
CCCCCTGTCAGCAAGAGTACTCCATCATTGATCTCACTGTCATGGCGGCTGAGATGGCATAACGAGAATGCGGCC  
GCGTCGAGGATGTCGTTATCAAATTGCTGGAAGTTAAATTTCTGGGGTTCTACAACGGCTGGAACAAGTACCTGAA  
TAACGACTACTGGCATAACCGAGACGACGCAGGCGTTCGTGATGACAGACACGGCGGAGGACGCCAAGTTTGTGTTG  
TTGGCGTTCCGTGGCACGGAGATGTTGAACATGCGGAGACTGGATGACGGACTTCGACGTGTGCGGAAAGGGCATGG  
GCGACATGGGCAACGTTACCTCGGTTTCTCAAGGCACTCGGACTCCAAGACGAGGACGCCACGGACGCCTTGA  
CGCTTCCCTCGGGAAGCCCCACCCGCCCTCTCAAGGCAAGCATTTCTCCTACTACCAGCTCCGGGAGGTGCTC  
CGGAAGCAGCTCGAGAAGCACCCCAATGCGCAGATCGTCGTACGGGGCACAGCTCGGCGGCGGCTCGCCGTCA  
TCTTCCCGGCGCTCCTCGGATGCACGAGGAGAAGGACATCCTGGACAGGCTCGCCGTGCTGGTGACCTATGGCCA  
GCCGCGCTCGGGACGACAAGTTCGCCGAGTATTTCAAGCCAAGGTGGTGAAGGCGACGGGAGCGGCATACGGC  
CGCTTCGTGTACCGGTACGACATCGTGCCCCGGGTGCCGTTGATGCGCCGCCCTGTCAATGTTCAAGCACGGAG  
GGGAATGTGTCTACTTCAACGGGTGGTATGACGGCAAGGTGCTCGCAGGGGACGCGCCGAACCCCAACTACGTCAA  
CCCGCTTTACCTGCTTTCAAAGTACGGCAACGCGCTGGGCGACCTGGTGAAGGCGGCATTCTGTGGAAGACGGCC  
GGCAGCGAGTATCGCGAGAGCTTCGCGTCTTGCTCTACCGGTGTGTCGGCCTGATCATCCTGGCGTCCGCTCGC  
ACAGCTACACGACTACCCAATGCCGTCCGCTCAGCGGCATCGCGTCATCCAAGAAAGTCTAAGACCGAGCAAC  
CGGGTCCGGGTGGAGAGACGATCAGAGAGAGACAAGTGTGAAAGATTTCTGGGGAGCTATGAATAAGTTGAGTGT  
GTATGTGATGTGTGTGCAAATTGTACTGCGTGTGTCGACGTGGTCTCTCTCAGCAATGATTAGTATACAAGCATATT  
TAGATAACTAGTTGTTGTAACCTTCAAAGATGGATTGTGACTCTGTGAGCGTACGTATAGCCGGGCAGCAGAAGCC  
ACTGATTCAGCAAGCGAG

## Bradi4g22620 (Alcohol deshidrogenasa)

AGAAGCCGCGCCAGCACCCCTGTTTTCGGGCGGCTACCTTCTCCAAGAAAATAATATTCCTTCTTCTTTCCCC  
GCTTGCGCTCCAAGCTAAACTAATCCCTGTCTCCCTCCTCCAGCACCAGGCACCAGTATTTATACTGGGTTGGCCT  
CGCCCTCGTTCTCACCACACATCTCATCAGCGAATACGAGAGGAGTACAGAGCAACAGAGATCCATCTTTCTCT  
ATTGAGTTCGTGAAAAAAGCTAGCGACCGGGAGTAATGGCGACCGCCGGGAAGGTGATCAAGTGCAGAGCTGCGGT  
GGCATGGGAGGCCGGGAAACCACTGTCAATCGAAGAGGTGAGGTGGCGCCGCCGAGGCCATGGAGGTGCGCGTC  
AAGATCCTCTACACCGCCCTCTGCCACACTGATGTCTACTTCTGGGAAGCCATGGGGCAAACCTCCGGTTTTCCCTA  
GGATCTTAGGCCATGAAGCTGGGGCATTGTTGAAAGTGTGGGAGAAGGCGTGACCAGCTCGTGCCGGGTGACCA  
TGTCTTCCGGTGTTACCGGTGAGTGTAAGGAGTGTGCTCACTGCAAGTCAGAGGAGAGCAACCTGTGTGACCTC  
CTCAGGATCAACGTTGACCGAGGCGTGATGATCGGCGATGGTCAGTCCCGCTTACCATTGACGGGAAACCAATTT  
TCCACTTTGTGCGCACATCAACCTTCAGCGAGTACACCGTGATCCATGTGGGTGCCTAGCGAAGATCAACCTGA  
GGCGCCCTCGACAAAGTTTGTGTTCTTAGCTGCGGTATTTCAACTGGTCTTGGTGCACACTCAATGTGGCGAAA  
CCGAAAAAGGATTCAACTGTGGCGATTTTCGGTCTTGGGGCTGTAGGCCTTTCTGCCATGGAAGGGGCCAGGATGG  
CTGGGGCATCAAGGATCATTGGTGTGGACATGAACCCTGCTAAATTTGAACAAGCTAAGAAATTTGGGTGCACTGA  
CTTTGTGAACCCAGGGACCACACCAAGCCAGTCAAGAGGTGCTTGTGGAGATGACCAACGGAGGCGTGGACCGG  
GCCGTCGAGTGCACTGGCAACGTCAACGCCATGATCTCCGCCTTCAATGCGTCCATGATGGTTGGGCGTGGCAG  
TGCTGGTGGGAGTCCCCACAAGGAGGCCGTGTTCAAGACCCACCAATGAACCTCCTCAACGAGAAGACCCTGAA  
AGGAACCTTCTTCGGCAACTACAAGCCGCGCACCGACCTGCCAGAAGTCGTGAGATGTACATGAGGAAGGAGCTG  
GAGCTGGAGAAGTTCATCACCCACAGCGTGCCATTCTCGCAGATCAACACGGCGTTCGACCTCATGCTCAAGGGG  
AGGGCCTGCGTGCATGCGGATGGAGGAGTAGATCAGCAGCCTGCCGCTGCTTAAAATTTGTGCATAAGAAGG  
ACATGAAAAAGAAGAGTTTCCAATGTTTCCTTAGTAATAATGATGTACTATCGGTCGTCGATTTGTTGGACTTT  
TAGTTTCTTGTGAGTGTGCTTCATCAGCAATTAAGCTTCCGTTTAGCGTGAAATTGACATTTTCTGAACAAAAGT  
AGTGATAATAACTTTGCATTTTCTGTGATA

## Bradi3g58010 (Amilasa)

TTCTAAAGTGTGCAAGTTGTAAGTAGCTTCATCCTGTGCCGCGCTGAAGAACATGGCGAATAAACTCTTGCCCTT  
GTCCCTGTTCTCGTCTGCTTGGTCTGTGTCCTCAACTTGGCTCCGGGCAAATCCTGTTCAGGGTTTCAACTGG  
GAGTCGTGGAAGCAGAATGGGGGATGGTACAACCTGCTGAAGGGCAAGGTGAACGACATCGCCGCCCGCGGTCA  
CCCACGTCTGGCTCCCTCCGCCGTCGAGTCCGTGGCGAACAAGGTACATGCCGGGGCGGTGTACGACCTGGA  
CGCGTCCAAGTACGGCAACGCGGCGCAGCTCAAGGCCCTGATCGGCGGTTCCACGACAAGGGCGTCAAGGTGATC  
GCCGACATCGTCATCAACCACCGCACGGCGGAGCACAAGGACGGCAGGGGGATCTACTGCCTCTTCGAGGGCGGCA  
CCCCGGACGCCCGCTCGACTGGGGCGCCACATGATCTGCCGCGACGACAAGCCCTACGCCGACGGCACGGGCAA  
CCCCGGACACGGGCGCCGACTTCGGCGGCGGCCGACATCGACCACCTCAACACGCGCTCCAGGAGGAGCTCACG  
GCCTGGCTCAACTGGCTCAAGACCGACATCGGCTTCGACGCCTGGCGGCTCGACTTCGCCAAGGGATACTCGGCCG  
ACGTGGCCAAGGTGTACATCGAGAAGACGGAGCCGGATCTCGCCGTGGCCGAGGTGTGGACGCCGCTGGCCTACGG  
CGGGGACGGCAAGCCGGATGCCGACCAGGACGCGCACCGGACAGGAGCTGGTGAAGTGGGTGGACAAGGCCGGGGT  
GCCGCCGGGCGGCCACGGCTTCGACTTACCACCAAGGGCATCCTGAACGTGGCCGTCGACGGCGAGCTGTGGC  
GGATGCGCGCCGCGGACGGCAAGGCGCCCGCATGATCGGCTGGTGGCCAGCCAAGGCCGTACCTTCGTCGACAA  
CCACGACACCGGCTCCACGACGCGCATGTGGCCGTTCCCTCCGACAAGGTCAATGCAGGGCTACGCCTACATCCTC  
ACGCACCCTGGAGCCCATGCATCTTCTATGACCATTCTTCGACTGGGGCTGAAGGAGGAGATCGAGCACCTGG  
TGGCCATCAGGACCAAGCAGGGGATCCACAAGGACAGCAAGCTGCGGATCATCGAGGCCGACGCCGACCTTTACCT  
GGCCGAGGTCGACGGCAAGGTATCACCAGCTCGGGTCTAGATTGACGTCGGGCACCTATCCCGAAGGCTTC  
CAGGTGGTCGCGCACGGCAAGGACTACAGCGTCTGGGCGAAGAAATGAGCAGAAATACTGGATGGTTATTTGTTA  
TTTTCTCTGTTTCGTCCACATGGTACTACGTACGGGGAGGGAAATCCCTTGACGTGAGTTGCCTATGTACGGTTA  
GTACTTCATCCGTTAGAATGATGATCAGGGACATGCGTTTCTATTTTTGATGAATAACAATCGATGAATGTTCTCT  
CTTTTGTGGTTGCGCTA

## **Anexo 4**

- **Soluciones para tinción con DAB y NBT**

### **Buffer fosfatos 0.2 M pH 7.6 (500 ml)**

1.56 g fosfato monobásico

23.34 g fosfato dibásico

Diluir los fosfatos en 25 ml de ddH<sub>2</sub>O, posteriormente aforar a 475 ml, verificar pH.

El pH se obtiene de la mezcla de fosfatos, agregando más fosfato monobásico o dibásico en caso de ser necesario.

### **Buffer TRIS acetato 50mM pH 7.6**

12.11 g TRIS por litro de H<sub>2</sub>O desionizada

Para llevar a pH se agrega ácido acético (2 ml aprox.)

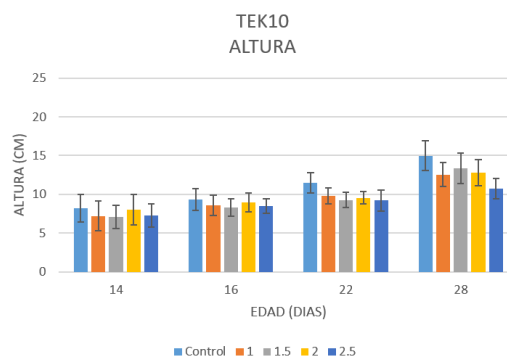
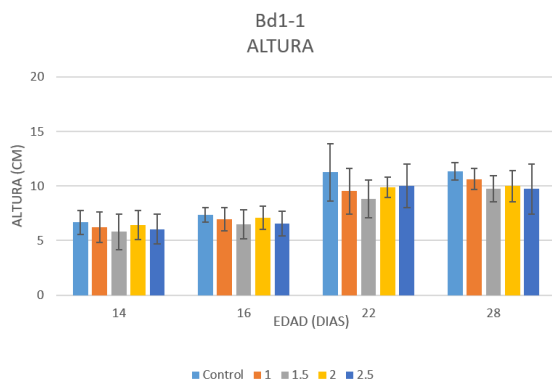
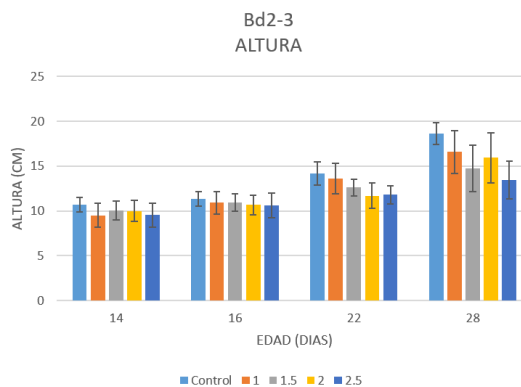
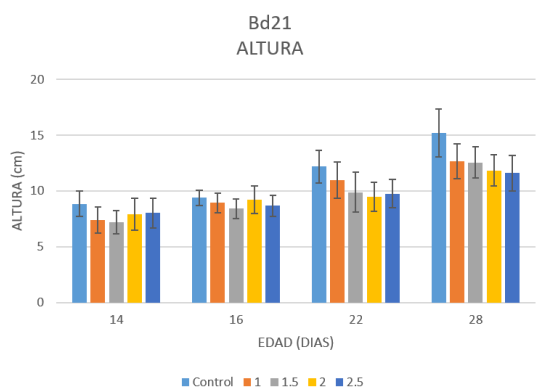
### **Glicerol 40%**

101.1 ml glicerol 99% en 149 ml ddH<sub>2</sub>O.

## Anexo 5

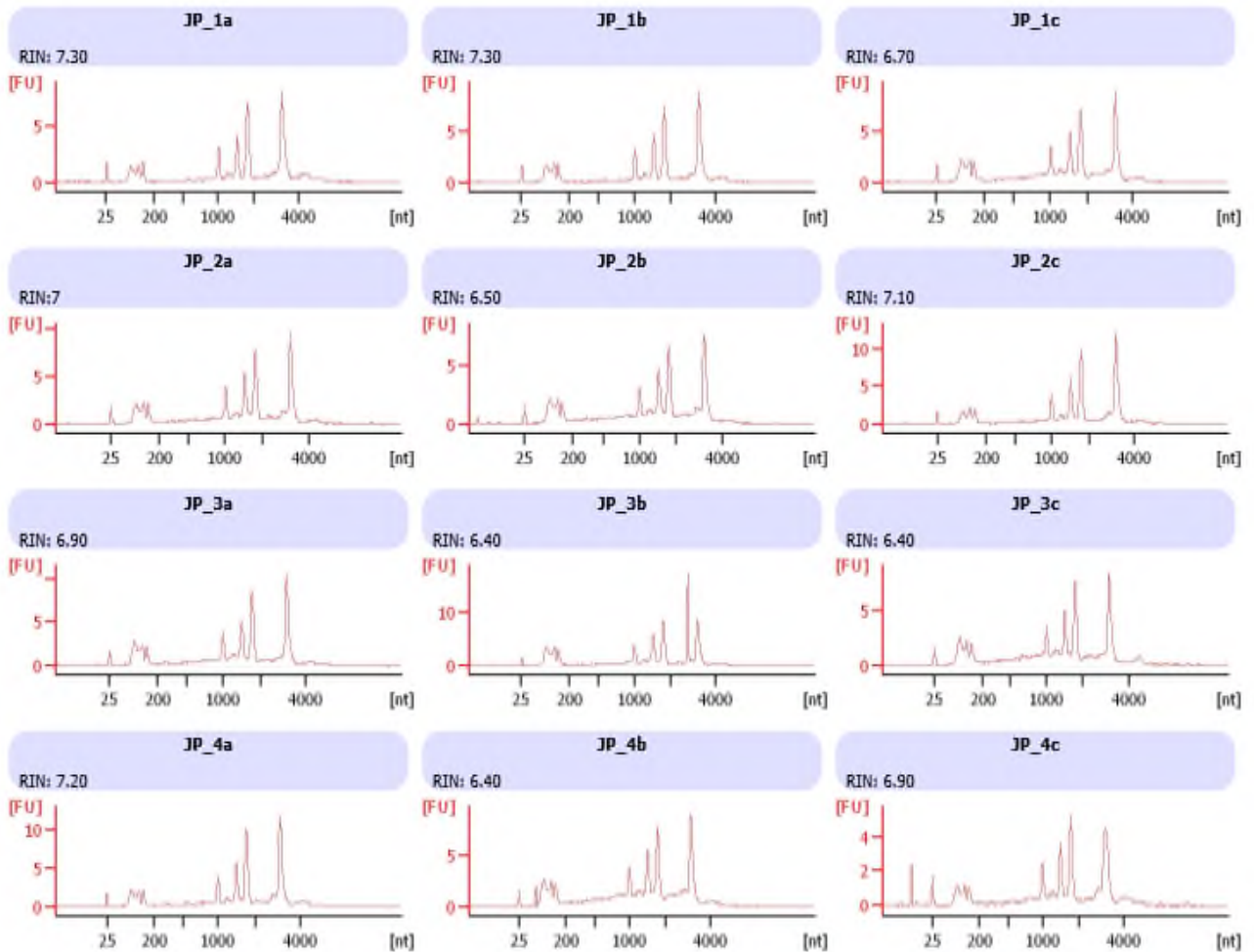
- **Datos fisiológicos de altura de los cuatro ecotipos de *Brachypodium distachyon* sometidos a estrés por inundación.**

Graficas de tres experimentos independientes de los cuatro ecotipos. Se calculó el promedio y la desviación estándar, no se observa una variación significativa, el aumento gradual es normal de acuerdo a la edad, por lo que no se tomaron como datos estadísticos determinantes para la tolerancia.



## Anexo 6

- Graficas de Bioanalyzer para cálculo de integridad de las muestras de RNA para secuenciación.



## Anexo 7

- Artículo publicado en Scientific Reports, junio 2016. JCR IF: 5.228 (2015).

www.nature.com/scientificreports

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor

Received: 27 January 2016  
Accepted: 19 May 2016  
Published: 10 June 2016

Irma Karla Rivera-Contreras<sup>1,2,\*</sup>, Teresa Zamora-Hernández<sup>1,2,\*</sup>, Ariana Arlene Huerta-Heredia<sup>3,4</sup>, Jacqueline Capataz-Tafur<sup>4</sup>, Blanca Estela Barrera-Figueroa<sup>1</sup>, Piyada Juntawong<sup>5</sup> & Julián Mario Peña-Castro<sup>1</sup>

When excessive amounts of water accumulate around roots and aerial parts of plants, submergence stress occurs. To find the integrated mechanisms of tolerance, we used ecotypes of the monocot model plant *Brachypodium distachyon* to screen for genetic material with contrasting submergence tolerance. For this purpose, we used a set of previously studied drought sensitive/tolerant ecotypes and the knowledge that drought tolerance is positively associated with submergence stress. We decided to contrast aerial tissue transcriptomes of the ecotype Bd21 14-day-old plants as sensitive and ecotype Bd2-3 as tolerant after 2 days of stress under a long-day photoperiod. Gene ontology and the grouping of transcripts indicated that tolerant Bd2-3 differentially down-regulated *NITRATE REDUCTASE* and *ALTERNATIVE OXIDASE* under stress and constitutively up-regulated *HAEMOGLOBIN*, when compared with the sensitive ecotype, Bd21. These results suggested the removal of nitric oxide, a gaseous phytohormone and concomitant reactive oxygen species as a relevant tolerance determinant. Other mechanisms more active in tolerant Bd2-3 were the pathogen response, glyoxylate and tricarboxylic acid cycle integration, and acetate metabolism. This data set could be employed to design further studies on the basic science of plant tolerance to submergence stress and its biotechnological application in the development of submergence-tolerant crops.

Plants are genetically prepared to cope with soil flooding, as this is a challenge commonly faced during their lifespan. Flooding can be divided into two general categories: waterlogging, when water only covers the roots, and submergence, when even aerial tissues are left underwater<sup>1</sup>. In natural environments, flooding patterns have a strong influence on the type of species that colonize an area<sup>2</sup>. In agricultural fields, flooding can cause crop yield reductions that amount up to billions of dollars of losses<sup>1,3</sup> and can cause a descendent economic cycle that can lead to poverty and migration<sup>3,4</sup>. Whether a consequence of days-long torrential rain associated with a tropical hurricane, or an hour-long winter rain, flooding can: disrupt O<sub>2</sub> diffusion from the air to plant tissues, making O<sub>2</sub> available at subnormal concentrations<sup>5</sup> (<21% w/w, hypoxia); increase pathogen accession to cells<sup>6</sup>; block natural light<sup>7</sup>; and, when the water recedes, can create oxidative stress during recovery<sup>8</sup>. The systematic study of plant responses to waterlogging, submergence, hypoxic and anoxic stress has identified that plants take action towards diminishing the deleterious effects of these drawbacks. These responses also have normal physiological

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México. <sup>2</sup>División de Estudios de Posgrado, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México. <sup>3</sup>Catedrática CONACyT-UNPA, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México. <sup>4</sup>Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México. <sup>5</sup>Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.J. (email: fscipdj@ku.ac.th or pjuntawong@gmail.com) or J.M.P.-C. (email: julianpc@unpa.edu.mx or julianp@prodigy.net.mx)

roles during germination<sup>9</sup>, organ development (reviewed in ref. 10), and crosstalk to other stresses, such as soil compaction, hydrocarbon pollution<sup>11</sup>, droughts, oxidative stresses<sup>8,12</sup>, the dark<sup>13</sup> and pathogens<sup>6</sup>.

In plants, O<sub>2</sub> supply disruption is confronted with a quick and sophisticated transition from an aerobic to anaerobic fermentative metabolism that can be divided into three phases: sensing, setting and maintenance. Oxygen sensing is achieved through constitutively expressed transcription factors of the *ETHYLENE RESPONSE FACTORS* group VII (*ERFs-VII*; reviewed in ref. 14), which possess a characteristic Met-Cys N-terminal domain<sup>15</sup> (domain CMVII-1). Under normoxic (21% O<sub>2</sub> w/w) conditions, ERFs-VII are substrates for the N-end rule enzymatic post-translational removal of Met<sup>16,17</sup> and the concomitant oxidation of its second cysteine to cysteine sulfinic, or cysteine sulfonic acid by plant cysteine oxidases<sup>18</sup> (PCO). This step occurs in the presence of O<sub>2</sub> and the gaseous phytohormone nitric oxide (NO) and constitutes a signal for proteasome degradation<sup>9</sup>. Under hypoxic-anoxic conditions, cysteine oxidation is no longer performed and ERFs-VII proteins are stabilized and directed to the cell nuclei, where they induce transcriptional activation, directed towards setting an effective fermentative metabolism<sup>16,17</sup>. During this stage, a group of genes collectively known as the Hypoxia Core Genes (HCG) are induced; these include well-known fermentative enzymes such as alcohol dehydrogenase (ADH), pyruvate decarboxylase (PDC), alanine aminotransferase (AAT) and glutamic acid decarboxylase (GDC). HCG help to avoid the over-reduction of the NAD<sup>+</sup>/NADH pool and maintain ATP synthesis through glycolysis and diverse fermentative routes at the expense of starch reserves<sup>9,19,20</sup>. This transcriptional activation is complemented with a translational change that has, as a consequence, the preferential ribosome loading of hundreds of signalling transcripts under anoxic conditions<sup>21</sup>.

During maintenance of the anaerobic metabolism, different auto-regulatory loops modulate the intensity of the response, of which two examples have been characterized: one involving PCO and the other the *HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR 1* (*HRA1*). PCO promotes ERFs-VII cysteine oxidation and protein targeting to proteasomes<sup>18</sup>, while *HRA1* inhibits ERFs-VII binding to DNA through direct protein-protein interactions<sup>22</sup>. Both PCO and *HRA1* are direct transcriptional targets of ERFs-VII. At the maintenance stage, a second group of strongly hypoxia-inducible ERFs-VII takes on the role of sustaining the transcriptional expression of HCG after the initial response<sup>23</sup>. If starch reserves are sufficient to fuel anaerobic energy extraction and allow survival until the water recedes, during reoxygenation, the plant cell has to manage a strong reactive oxygen species (ROS) burst, and paradoxically, a dehydration stress. Both challenges are faced with the induction of oxidoreduction enzymes and ABA sensitization<sup>9</sup>. Interestingly, at this stage, there is also another auto-regulatory loop that involves ERFs-VII, ABA and NO<sup>9</sup>.

The increased possibility of susceptibility to pathogen attack during submergence is counteracted with the expression of WRKY transcription factors that mobilize a toolbox of genes allowing the plant to recognize and act on bacteria and fungi, such as leucine-rich repeat kinases (LRRK), receptor-like kinases (RLK), wall-associated kinases (WAK) and peroxidases (PER)<sup>6</sup>.

The management of low light accessibility is achieved through a set of molecular events leading to increased angle (hyponastic) repositioning of the leaves outside the water level, thus raising the possibility of sustaining photosynthetic activity under stress<sup>1</sup>. Recently, it has been shown that the gaseous hormone ethylene, which accumulates around submerged tissues, coordinates cell expansion and division to promote the hyponastic response through the inhibition of *CYCLINA2;1* expression (*CYCA2*)<sup>24</sup>.

In addition to these general mechanisms – mostly discovered in the model plant *Arabidopsis thaliana* – plants that are native of flood-prone environments confront submergence with a set of physiological adaptations, such as aerenchymas, leaf gas films and focalized hyponastic responses<sup>5</sup>. However, most wild and agricultural relevant plants do not show these adaptations or have not developed them effectively.

The grass family (*Poaceae*) is one of the most important sources of products that satisfy human nutritional needs; cultivars of four domesticated grasses, namely maize (*Zea mays*; *Panicoidae*), wheat (*Triticum* *ssp*; *Pooideae*), sugarcane (*Saccharum* *ssp*; *Panicoidae*) and rice (*Oryza sativa*; *Ehrhartoideae*), provide ≈50% of human caloric intake, with this proportion being even higher in developing countries<sup>25</sup>. However, molecular characterization of the mechanisms for tolerance to submergence in the grasses is uneven: in rice, this endeavour has been sustained for decades<sup>26</sup>, it has recently started in barley (*Hordeum vulgare*)<sup>27</sup> and maize<sup>28</sup> and only physiological characterization has been defined in wheat and sugarcane<sup>29,30</sup>. The natural genetic diversity of rice and maize has been used to find molecular mechanisms that are differentially expressed in tolerant versus sensitive varieties<sup>28,31</sup>.

Four loci associated with submergence tolerance have been characterized: *SUBMERGENCE1* (*SUB1*), *SNORKEL* (*SK*) and *qAG-9-2* in rice and, more recently, *Sub1o6* in maize. The genetic determinants of the *SUB1* and *SK* loci are ERFs-VII genes, *SUB1A* and *SK1/2*, respectively, and these orchestrate two different survival strategies<sup>2</sup>. *SUB1A* promotes the low-oxygen quiescence strategy (LOQS), which inhibits the gibberellic acid (GA) response, starch use, flowering and elongation to save energy resources while submerged<sup>31–34</sup>; and *SK1/2* orchestrates the low-oxygen escape strategy (LOES), which exacerbates GA signalling and promotes internode elongation, to escape submergence and reach the light<sup>35</sup>. *qAG-9-2* contains *TREHALOSE PHOSPHATE PHOSPHATASE 7*, a gene that permits submerged seed germination by altering the trehalose-6-phosphate (T6P)/sucrose ratio, with the consequence of promoting an accelerated anaerobic catabolism with amino acids as the final fermentative metabolites<sup>36</sup>. *Sub1o6* is a maize locus that encompasses different submergence-induced genes, of which the most promising candidate as the main genetic determinant is *HAEMOGLOBIN 2* (*HB2*) – a NO scavenger – that is constitutively expressed in tolerant cultivars and the expression of which is sustained under submergence<sup>28</sup>.

The discovery of the *SUB1* locus has allowed plant breeders in Asia to provide farmers with new non-transgenic varieties that have increased survival and yield rates after withstanding prolonged flooding<sup>3,37</sup>. *SUB1A-1* also improves drought tolerance<sup>8</sup> as well as the quality of plant biomass as a raw material for biofuels<sup>38</sup>. Recently, the down-regulation of the N-terminal rule enzyme *PROTEOLYSIS6* that destabilizes ERFs-VII proteins<sup>14</sup> has been used to obtain barley varieties tolerant to waterlogging<sup>27</sup>. Research using the genetic diversity

Ecotype	Photosystem activity under drought <sup>a</sup>	Leaf water content under drought <sup>b</sup>	Leaf biomass accumulation <sup>c</sup>	Flowering time <sup>d</sup>	Genotype class <sup>e</sup>	Submergence tolerance <sup>f</sup>
Bd21	Moderate	Moderate	Low	Early	1	Low
Bd2-3	Low	Low	Low	Medium	3	Moderate
Bd1-1	High	High	Moderate	Late	2	High
Tek10	High	High	High	Late	-	High

**Table 1.** *Brachypodium distachyon* ecotypes studied and their phenotypic characteristics. <sup>a</sup>Reported as Fv/Fm ratio<sup>32</sup>. <sup>b</sup>Reported in<sup>43</sup>. <sup>c</sup>Reported in<sup>46</sup>, except Tek10. <sup>d</sup>Defined in this study.

of *Arabidopsis*<sup>39</sup>, rice<sup>40</sup> and aquatic plants<sup>41,42,43</sup> has shown that there are other types of yet uncharacterized and species-particular molecular mechanisms that lead to improved submergence tolerance.

In this work, we employed ecotypes of the monocot model *Brachypodium distachyon*<sup>44</sup> with different drought stress tolerances to screen for submergence-tolerant and submergence-sensitive variants. We then performed a comparative RNAseq-based transcriptomic study of these contrasting ecotypes under control and submergence stress in the presence of long-day photoperiod (16 h light/8 h dark). We hypothesized that the natural genetic diversity of this non-domesticated grass would allow us to find integrated mechanisms of tolerance.

## Results and Discussion

### Detection of *Brachypodium* ecotypes with contrasting tolerance to submergence stress tolerance.

*Brachypodium* ecotypes have been previously screened for genetic material showing differential photosystem activity under drought stress<sup>45</sup> and for contrasting flowering time and biomass architecture<sup>46</sup>. As Fukao *et al.*<sup>8</sup> found that rice cultivars with enhanced submergence tolerance were also tolerant to drought stress; we decided to use this previous knowledge to select ecotypes that would display differential tolerance to submergence stress. We thus selected four ecotypes representing early or late flowering and high or low photosystem remnant activity under drought stress (Table 1).

Submergence stress has been applied to plants in different formats; for example, continuous dark<sup>3,18</sup>, continuous light<sup>47</sup>, a natural light cycle with midday harvesting<sup>33,34</sup> and an artificial light/dark cycle with multiple collecting times<sup>32,48</sup> or single collecting times<sup>38,49</sup>. Each approach has allowed the discovery of different submergence molecular responses, for example, lipid dynamics (continuous light)<sup>47</sup>, flowering inhibition (light/dark cycling)<sup>32</sup> and dark-stress crosstalk (continuous dark)<sup>5</sup>.

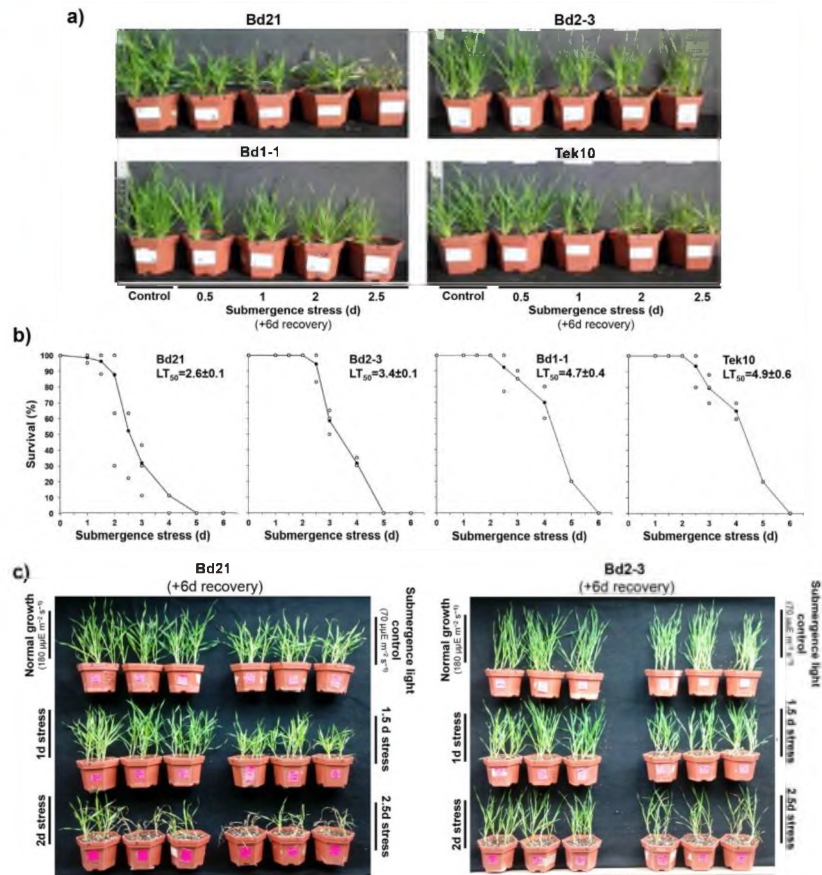
In the present research, we decided to apply submergence stress under a controlled long-day (LD) light regime (16 h light/8 h dark) and to contrast the ecotypes tolerance at the juvenile (pre-flowering) stage. Our aim was to characterize a submergence response that included active circadian cycle oscillations<sup>32</sup> and the management of light-dependent oxidative stress<sup>5</sup>.

All four selected *Brachypodium* ecotypes expressed a quiescent submergence response, since their plant tissue did not elongate after submergence stress (Fig. 1a). Additionally, *Brachypodium* displayed known stress affections, such as leaf death and stunted growth, when compared to controls grown side-by-side (Fig. 1a). This ecotype selection and format of submergence stress allowed the detection of contrasting tolerance material by both visual examination (Fig. 1a) and by median lethal time (LT<sub>50</sub>) quantification (Fig. 1b). Bd21 was the most sensitive ecotype (LT<sub>50</sub> = 2.6 ± 0.1 d), while Bd2-3 was a moderately tolerant ecotype (LT<sub>50</sub> = 3.4 ± 0.1 d) and Bd1-1 and Tek10 were the most tolerant ecotypes, with similar LT<sub>50</sub> values (4.7 ± 0.4 and 4.9 ± 0.6 d, respectively). These data support the reports that drought and submergence stress share common tolerance mechanisms<sup>8</sup>, since the ecotypes with most tolerant photosystems to drought stress (Bd1-1 and Tek10; Table 1) were also the most tolerant under submergence stress.

### *Brachypodium* ecotypes with contrasting tolerance to submergence and transcriptomic analysis.

To find the transcripts, pathways and mechanisms differentially expressed in the submergence-susceptible and submergence-tolerant ecotypes of *Brachypodium*, we used a sequence-by-synthesis differential gene expression approach (RNA-Seq). As submergence-sensitive ecotype we choose Bd21 and as its tolerant counterpart, we decided to compare with the most developmentally similar ecotype Bd2-3. Although Bd1-1 and Tek10 were the most tolerant ecotypes, they have a more extended juvenile stage, up to 4-5 months to flowering transition when compared to Bd21<sup>46</sup>. Bd21 and Bd2-3 have a closer developmental program and temporality in their juvenile stages (Table 1); still, they have a contrasting submergence tolerance by both visual and quantitative parameters (Fig. 1b,c). Highlighting the importance of comparing similar developmental stages, it has been shown that starch management is different in distinct developmental stages<sup>50</sup> and that *SUB1A-1* had differential activities in the juvenile (pre-flowering) and mature (post-flowering) stages in *Arabidopsis*<sup>38</sup>. In order to use Bd1-1 and Tek10 as contrasting materials, we plan in the future to screen for submergence-sensitive material of similar developmental pattern.

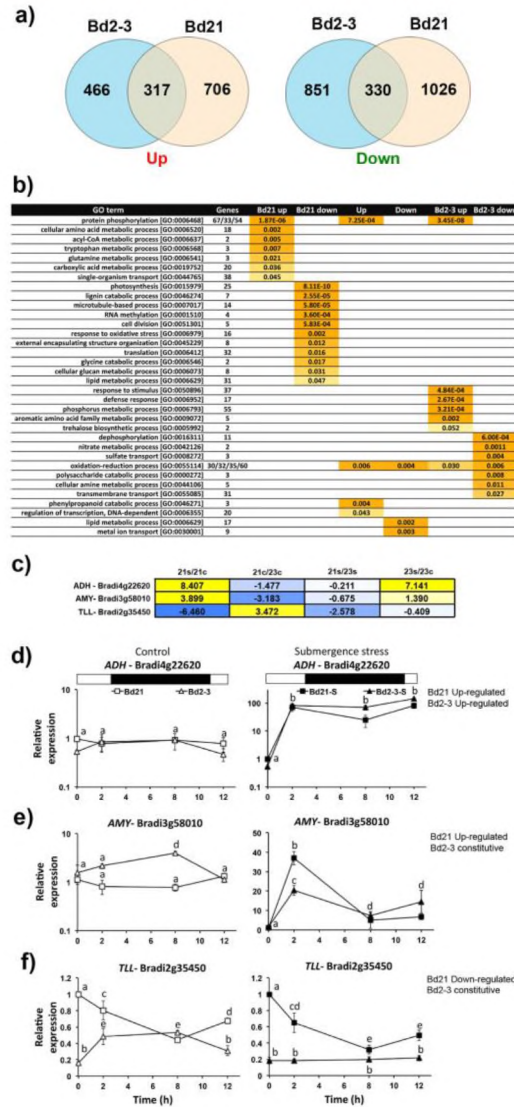
In choosing the appropriate sample collection time, we considered the plants' circadian cycles, since diurnal cycle and submergence stress have been jointly studied in few reports<sup>32,48</sup>. Based on the Zeitgeber Time (ZT0 = start of daylight), we decided to collect at ZT13 (3 h before the start of night). Our rationale was that this would allow us to incorporate in our data set diurnally oscillating transcripts that typically have low expression values<sup>31</sup> and weak statistical significance at the more frequently used midday collection time, as previously shown for *FT* and *CONSTANS (CO)*<sup>33</sup>. We expect that these steps will increase the future usefulness of this data set to further characterize the importance of plants' diurnal cycle in the response to submergence stress.



**Figure 1.** Survival of *Brachypodium distachyon* ecotypes after submergence stress. (a) Representative 20-day-old plants of each ecotype 6 d after being removed from the indicated submergence stress length. (b) Survival expressed as the median lethal time ( $LT_{50} \pm S.D.$ ) of each ecotype 6 d after being rescued from the indicated submergence stress. Each dot is an independent experiment.  $LT_{50}$  was calculated from three independent experiments in which all the ecotypes were present ( $n = 15$  plants). (c) Phenotypic responses of the ecotypes selected for transcriptomic comparison (Bd21 and Bd2-3) to different lengths of time of submergence stress. Bd21 and Bd2-3 were considered as sensitive and tolerant ecotypes, respectively. Submergence light control and 2 d stress mRNAs were used for RNA-Seq and considered as the control (c) and stress (s) transcriptomes, respectively.

The chosen intensity was 48 h after imposing the stress, since our survival data and visual examination of stress symptoms indicated that this was the earliest point where the survival outcome was different between Bd21 and Bd2-3 (Fig. 1b,c); therefore, it would allow us to find mechanisms active in sustaining survival. As controls, we decided to use plants growing inside empty tanks located to the side of the submerged plants, thus removing any effects of light stress (Fig. 1c).

A total of  $2.91 \times 10^8$  reads were obtained, with  $1.4\text{--}3.1 \times 10^7$  individual library reads and  $>97\%$  positive mapping to the *Brachypodium* genome v 2.1 (Supplementary Table S1; GEO submission: GSE74222). To analyse the data, we selected an FDR of  $5.0 \times 10^{-05}$  and a  $\text{Log}_2\text{FC}$  value  $>1.5$  or  $<-1.5$  for up- and down-regulated genes, respectively. There were 317 commonly up-regulated transcripts, 466 exclusively up-regulated in Bd2-3 and 706 exclusively up-regulated in Bd21. Regarding down-regulation, 330 transcripts were common, while 851 and 1026 were exclusive for Bd2-3 and Bd21, respectively (Fig. 2a). For abundance reference purposes, we looked for the most abundant up-regulated transcript in both ecotypes under submergence and it was Bradi4g44496, an



**Figure 2. Transcriptome mobilization in the sensitive and tolerant ecotypes of *Brachypodium distachyon*.** (a) Venn diagrams showing the number of commonly and exclusively up- and down-regulated transcripts in the ecotypes after 2 d submergence stress. Data obtained by RNA-Seq from three independent experiments (for each ecotype,  $n = 5$  plants). (b) Gene ontology categories commonly and exclusively up- or down-regulated in the Bd21 and Bd2-3 ecotypes ( $p \leq 0.05$ ). (c) Log<sub>2</sub>FC of all four possible comparison categories of the selected transcripts representing three different groups to compare Bd21 and Bd2-3: Up-Up (commonly up-regulated; *ADH*), Up-Cons (up-regulated in Bd21, constant in Bd2-3; *AMY*) and Down-Cons (down-regulated in Bd21, constant in Bd2-3; *TLL*). (d-f) Transcript dynamics during the first 12 h of submergence stress, of *ADH* (d), *AMY* (e) and *TLL* (f). qPCR was used and the constitutive gene was *UBIQUITIN* (Bradi1g32860). Bd21 control at time 0 was selected as the relative expression (=1). The white and black symbols indicate control and submergence stress treatments, respectively. Data are the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments with two technical repeats; letters indicate differences between the ecotypes and submergence times indicated (two-way ANOVA,  $P$ -value  $< 0.05$ ).

unknown gene, with  $8539 \pm 689$  counts per million (CPM); while for the control samples, it was Bradi4g45010, which codes for the protein asparagine synthase 1, with  $9819 \pm 1866$  CPM (Supplementary Table S2).

With this information, we took three concomitant approaches to identify differentially expressed mechanisms. First, transcripts were classified into groups according to their differential expression among the two ecotypes (Bd21/Bd2-3), combining the three possible states of constitutively (Cons), up- or down-regulated; this resulted in eight groups (excluding constitutive-constitutive; Supplementary Table S2). This strategy was verified by fuzzy K-mean clustering analysis obtaining similar results (Supplementary Table S3). Second, a gene ontology (GO; Fig. 2b, Supplementary Table S4), an ortholog search (in *Arabidopsis* and rice) and PAGEMAN analysis of these transcript groups were performed (Supplementary Table S5, Supplementary Methods). Finally, a manual reconstruction of the known hypoxia pivotal biochemical routes was performed (Supplementary Fig. S1,2). As previously noted<sup>3,19</sup>, a significant proportion of the transcriptome corresponded to unknown/unannotated transcripts; this varied from 142 transcripts in the group preferentially down-regulated in Bd21, up to 246 transcripts in the up-regulated group in Bd21.

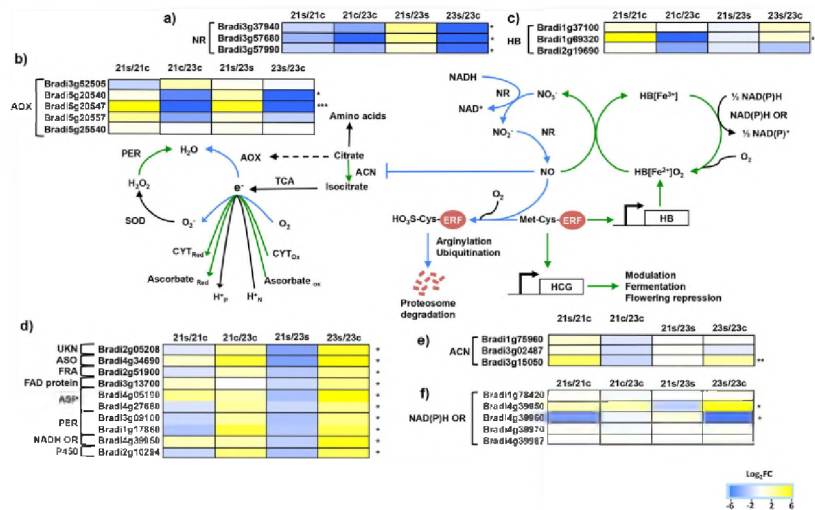
To observe the functionality of expression grouping and to investigate if our transcriptomic data could be useful to find genes with diurnal oscillatory expression, we chose one transcript to represent each group (Fig. 2c) and performed a dusk-dawn expression kinetics at ZT13, ZT15, ZT22 and ZT2, immediately after imposing the submergence stress (Fig. 2d). *ALCOHOL DEHYDROGENASE 1* (*ADH1*, Bradi4g22620; group Up-Up),  $\alpha$ -*AMYLASE 1* (*AMY1*, Bradi3g58010; group Up-Cons) and *TRIACYLGLYCEROL LIPASE LIKE 1* (*TLL1*, Bradi2g35450; group Down-Cons) were selected. As expected from prior knowledge and from the transcriptomic data, *ADH1* was rapidly induced in both ecotypes on submergence and its expression was sustained during the stress period; however, while we observed an up-regulation in Bd2-3, it was not statistically significant. *AMY1* was significantly active and up-regulated at night in the Bd2-3 control plants; however, at dusk under submergence stress it was 2-fold more up-regulated in Bd21 than it was in Bd2-3; its highest expression peak also shifted 7 h earlier in both ecotypes (Fig. 2e). As observed in the RNA-Seq data, *TLL1* was down-regulated under submergence stress in Bd21, but was constant and irresponsive in Bd2-3. Interestingly in the controls, it was inversely regulated during night-time between the ecotypes (Fig. 2f).

These examples that the collection time used, near the end of the day (ZT13) when diurnally controlled transcripts have higher expression<sup>21</sup>, allowed us to capture in our transcriptomic data genes under circadian control that can be further characterized by expression kinetics. Most studies on submergence or hypoxic stress have not explored the role of the circadian cycle regulated genes, since they have applied stress in the dark as a standard condition<sup>19</sup>. When submergence was applied under a 10 h light / 14 h dark cycle, it was found that *HEADING DATE 3a* (*HD3a*) – the rice ortholog to the florigen gene *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) – lost its circadian rhythmicity, leading to late flowering under stress, and that this effect was exacerbated by the rice *ERF-VII* gene *SUBMERGENCE1A-1* (*SUB1A*), itself up-regulated at the end of the day under regular growth<sup>32</sup>. This ERFs-VII up-regulation at the end of the day on both normal and submergence conditions has also been reported in soybean<sup>48</sup> (*Glycine max*) and has been observed in rice under dark stress<sup>13</sup>. The study of submergence stress under light conditions allowed involving very-long-chain fatty acids in a ROS regulatory role through acyl-CoA-binding proteins (ACBP), which are also capable of binding ERFs-VII proteins under normoxic conditions<sup>47</sup>.

**Oxidative stress management is differentially expressed in the submergence-tolerant ecotypes of *Brachypodium*.** GO analysis showed that tolerant Bd2-3 significantly expressed both up- and down-regulated transcripts in the GO category oxidation–reduction processes (GO:0055114), while Bd21 had down-regulated transcripts in the GO process of the response to oxidative stress (GO:006979; Supplementary Table S4; Fig. 2b). The 35 up-regulated transcripts in Bd2-3 included those that code for enzymes known to end-detoxify or use ROS<sup>52</sup>, such as ascorbate oxidases (ASO), ascorbate peroxidases (ASP), peroxidases (PER), p450 cytochromes (P450) and the Fe-S cluster biosynthetic protein frataxin (FRA)<sup>53</sup>.

Transcripts involved in oxidation–reduction processes that were down-regulated in Bd2-3 could be subdivided into two further categories: those that, despite being down-regulated due to submergence stress in Bd2-3, still had the same expression when compared to Bd21 under stress; and those that were truly down-regulated in Bd2-3, compared to Bd21. In the first subset, we found isoforms of organic acids modifying enzymes (e.g. phosphoenolpyruvate decarboxylase, aldehyde reductase and 6-phosphogluconate dehydrogenase), p450 cytochromes and ACC oxidases; these may indicate a stronger constitutive ethylene synthesis in Bd2-3 than in Bd21. In the second subset, we found more transcripts for p450 uncharacterized cytochromes and all three *Brachypodium* NITRATE/NITRITE REDUCTASE (NR) annotated genes (Bradi3g37940, Bradi3g57680, Bradi3g57990). NRs were expressed more in the control Bd2-3 than in Bd21 (combined transcript abundances of 760–913 and 90–307 CPM, respectively) and were more strongly down-regulated in Bd2-3 than in Bd21 by submergence stress (31.9–44.8 and 75.0–82.6 CPM; Log<sub>2</sub>FC –4.3 and –1.2, respectively; Fig. 3a). In this same category, we found two out of the five annotated ALTERNATIVE OXIDASE (AOX) transcripts (Bradi5g20540 and Bradi5g20547) differentially down-regulated in Bd2-3, when compared to Bd21 (constitutive or up-regulated; Fig. 3b).

The simultaneous down-regulation of transcripts for both ROS end-detoxification enzymes (AOX) and for ROS generating enzymes (NRs) in the tolerant ecotype Bd2-3 prompted us to look for the expression of components of the NO homeostasis cycle, especially transcripts coding for *HB1* and *NAD(P)H OXIDOREDUCTASES* (*NOR*)<sup>34</sup>. Three *HB*-like annotated genes were found: two of them were statistically constitutive in both control and stress plants for both ecotypes (Bradi1g37100,  $28.1 \pm 1$  CPM; and Bradi2g19690,  $1.22 \pm 1.03$  CPM) and a third transcript (Bradi1g69320, *HB1*), which was grouped with the Up-Cons genes because of its very low expression in the controls of Bd21 (0.14–0.19 CPM) and its constitutive expression in control Bd2-3 (26.2–69.2 CPM). Under submergence stress, *HB1* was strongly up-regulated in Bd21 but remained statistically constant in Bd2-3 (8.1 and 0.69 Log<sub>2</sub>FC, respectively; Fig. 3c). We found five annotated *NOR* genes, two of them were



**Figure 3. Integration of differentially expressed transcripts related to ROS management in tolerant and sensitive ecotypes of *Brachypodium distachyon* under submergence stress.** (a) *NITRITE REDUCTASE* (NR). (b) *ALTERNATIVE OXIDASE* (AOX). (c) *HAEMOGLOBIN* (HB). (d) Transcripts involved in different ROS end-detoxification pathways: UKN (unknown), ASO (*ASPARTATE OXIDASE*), FRA (*FRATAXIN*), ASP (*ASCORBATE PEROXIDASE*), PER (*PEROXIDASE*). (e) *ACONITASE* (ACN). (f) *NAD(P)H oxidoreductase* (OR). Blue indicates down-regulation and yellow indicates up-regulation in Log<sub>2</sub>FC values after 48 h stress measured by RNA-Seq. The letters s and c indicate stress and controls, and the numbers 21 and 23 indicate Bd21 and Bd2-3, respectively. The green and blue arrows indicate up- and down-regulated activity in tolerant Bd2-3. \*Significantly up- or down-regulated in Bd2-3, \*\*significantly up- or down-regulated in Bd21, \*\*\*significantly and inversely regulated in Bd2-3 and Bd21 (FDR < 0.05 × 10<sup>-3</sup>; Log<sub>2</sub>FC ≥ 1.5 or ≤ -1.5). Acronyms: SOD (superoxide dismutase), HCG (hypoxia core genes), TCA (tricarboxylic acid cycle), ERF (ethylene responsive factor), and NO (nitric oxide).

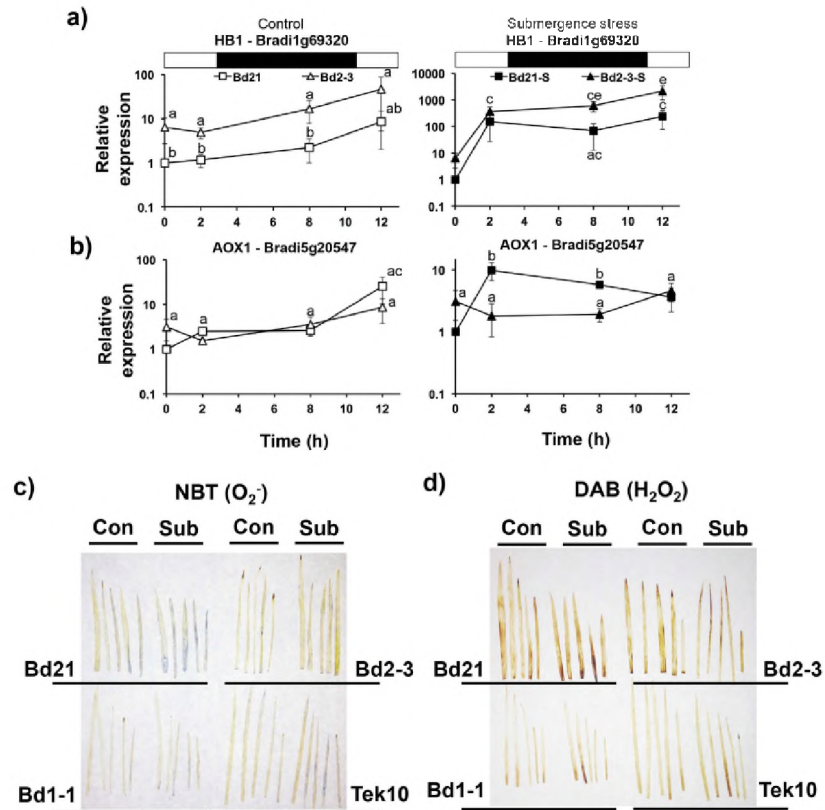
up- or down-regulated, but accounted only for 3% of global NOR transcripts, while the others were not differentially expressed among the ecotypes or treatments.

We further measured *HB1* and *AOX1* expression by qPCR during the first 12 h of stress. As indicated by RNA-Seq, Bd2-3 had a higher pre-stress *HB1* expression than Bd21. The difference was maintained until the early morning (ZT12), when its expression also increased in Bd21, probably indicating a normal ROS burst after the restart of illumination, as previously proposed by Lee *et al.*<sup>5</sup>. When submergence stress was imposed, *HB1* was more expressed in Bd2-3 than in Bd21, especially late at night (ZT22) and in the early morning (Fig. 4a). *AOX1* expression under control conditions was low and remained constant throughout the night and until the morning, when a significant increase in expression was detected only in Bd21; under submergence stress, *AOX1* expression in Bd2-3 overlapped with that of the control, however in Bd21 it was up-regulated throughout the night (Fig. 4b). These data may indicate that Bd21 under submergence stress suffers early oxidative stress and relies on downstream ROS management enzymes, such as AOX, while Bd2-3 ROS homeostasis is efficiently managed through *HB1*.

To visually assess the significance of these molecular data at the physiological level, leaves of all four *Brachypodium* ecotypes studied were stained after 24 h of submergence stress with NBT (Fig. 4c) and DAB (Fig. 4d), indicating superoxide and peroxide presence, respectively<sup>28</sup>. For both ROS, the submergence-sensitive Bd21 showed more staining than the more tolerant ecotypes. We also quantified formazan absorbance (superoxide) and Amplex Red oxidation (peroxide) after 24 h of submergence stress obtaining similar results (Supplementary Methods and Supplementary Fig. S3).

Taken together, these data suggest that an important determinant for submergence tolerance in these *Brachypodium* ecotypes is the coordinated management of oxidative stress, ranging from the attenuation of NO generation by NR down-regulation, NO scavenging through *HB1* and diversification of the final electron acceptor options, such as ascorbate and water (Fig. 3d). Interestingly, Campbell *et al.*<sup>28</sup> also found a constitutively expressed *HB1* concomitant with the down-regulation of AOX in maize varieties with superior submergence tolerance, opening the possibility that this mechanism may be extended to agriculturally relevant grasses.

In pre-flowering plants, the control of ROS toxicity would not be the only benefit obtained from a robust ROS management system. From the knowledge obtained in *Arabidopsis*, it would also have, as a consequence, the stabilization of ERF-VII proteins through NO removal<sup>9</sup> and, in turn, would improve stress sensing<sup>14,26,17</sup>, sustain the expression of HCG<sup>23</sup>, avoid tricarboxylic acid (TCA) cycle inhibition by NO at the aconitase step<sup>55</sup> (Fig. 3e),



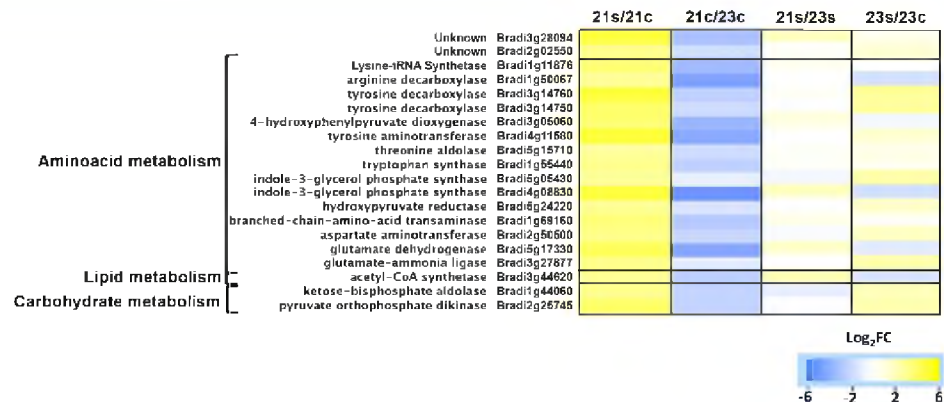
**Figure 4.** Expression of transcripts coding for ROS scavenging proteins and ROS detection in leaves of submergence-sensitive and submergence-tolerant ecotypes of *Brachypodium distachyon*. (a,b) Transcript dynamics during the first 12 h of submergence stress of *HB1* (a) and *AOX1* (b). qPCR was used and the constitutive gene was *UBIQUITIN* (Bradi1g32860). Bd21 control at time 0 was selected as the relative expression (=1). The white and black symbols indicate control and submergence stress treatments, respectively. Data are the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments with two technical repeats; letters indicate differences between the ecotypes and submergence times indicated (two-way ANOVA,  $P$ -value < 0.05). (c,d) Leaves from the submergence stress sensitive (Bd21) and tolerant (Bd2-3, Bd1-1 and Tek10) ecotypes after 24 h submergence stress and the respective controls showing *in situ* presence of superoxide (c) and hydrogen peroxide (d), as a result of NBT and DAB staining, respectively.

and create a positive regulatory loop, since the promoter of *HB1* is a direct target of ERFs-VII<sup>56</sup>. These steps would improve plant survival, not only to hypoxia but also to other stresses too<sup>12</sup>.

One scenario where NO removal would be counterproductive for submergence tolerance is during underwater germination. In germinating rice, *HB-like* transcripts are repressed during submergence<sup>57</sup>; this would allow NO to accumulate and degrade ERFs-VII, thereby promoting germination<sup>6</sup>.

**Signalling, phosphorylation and pathogen response.** Transcripts involved in protein phosphorylation (GO:0006468) were commonly up-regulated in both Bd21 and Bd2-3 (33), as well as being differentially induced (67 and 54, respectively). The analysis of these transcripts showed a complex picture that involves proteins of a diverse nature, such as wall-associated kinases, leucine-rich-repeat kinases and light-repressible kinases, and proteins containing the domain of unknown function 26 of both kinase- (CK) and lectin-like families (DUF26; Fig. 5). We propose that a differential plant pathogen response may harmonize the detection of this transcripts group.

Submergence increases the bacterial load by an order of magnitude, when compared to controls, and submerged plants counteract this with a coordinated pathogen (fungi and bacteria) response that includes pattern



**Figure 6.** Transcripts grouped in carboxylic acid metabolic processes (GO:0019752) that were up-regulated in *Brachypodium distachyon* Bd21 ecotype. Significantly ( $FDR < 0.05 \times 10^{-7}$ ) up-regulated ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$ ) in sensitive Bd21 after 48 h of submergence.

Three categories of primary metabolism were down-regulated under stress in Bd21, compared to Bd2-3 (Fig. 2b), namely photosynthesis (GO:0015979), translation (GO:0006412) and the lipid metabolic process (GO:0006629); for the first two categories, these transcripts coded for light-harvesting complex and ribosomal proteins, respectively. Transcripts in the lipid metabolic process were a diverse group coding for desaturases, lipases and synthases. These three categories have been well documented as relevant for stress tolerance. SUB1 rice plants maintain higher chlorophyll contents than intolerant varieties<sup>33</sup>, while hypoxic stress disrupts ribosome integrity<sup>21,63</sup> and lipid metabolism is selectively regulated under submergence stress<sup>47</sup> and increased by SUB1A-1<sup>32</sup>. For all three categories, most of the transcripts were more abundant in the Bd21 control plants than in Bd2-3 and were equally expressed during stress, highlighting the importance of pre-stress constitutive biochemical capabilities.

We reconstructed the pyruvate fermentative pathways active in *Brachypodium* (Supplementary Fig. S2). Even though we could not detect differential expression under stress between the ecotypes, we found transcripts simultaneously up-regulated for all the reported routes, starting at carbohydrates and leading to ethanol, lactate, alanine and gamma-amino butyric acid<sup>60,63</sup>. We also found transcripts for all steps of the glyoxylate and TCA cycles were active, and even up-regulated, in the critical steps needed to allow them to work together (Supplementary Fig. S2); for example, ACONITASE (ACN), MALATE SYNTHASE (MLS) and ISOCITRATE LYASE (ICL) were up-regulated. ICL was the 7th most abundant transcript under submergence stress ( $3799 \pm 174$  for Bd21 and  $5616 \pm 738$  CPM for Bd2-3). This multi-organelle and multi-route integration has been previously proposed as pivotal for anaerobic germination in rice<sup>64</sup>, not only as a carbon conservation pathway, but also for aldehyde detoxification and as an antioxidant pathway, through the alternative “suicide protein” functions of abundant ALDEHYDE DEHYDROGENASE (Bradi4g31310, ALDH;  $2699 \pm 87$  CPM). ALDH was constitutively more expressed in Bd2-3 controls ( $745 \pm 170$  and  $1956 \pm 405$  CPM, for Bd21 and Bd2-3 respectively;  $\text{Log}_2\text{FC} = -1.4$  Bd21c/Bd23c). Our transcriptome study highlighted that the integration of the glyoxylate and TCA cycles is relevant in juvenile plants facing stress. This integration should be completed with the characterization of malate transporters; we found five annotated as malate:oxoglutarate antiporters, which were transcriptionally active (four marginally down-regulated) and one constitutively more abundant in Bd2-3 (Bradi4g33550;  $\text{Log}_2\text{FC} = -1.6$  Bd21c/Bd23c).

As our submergence experiments were performed under the influence of long-day illumination, we looked for transcripts annotated as coding proteins of the Calvin cycle (Supplementary Fig. S4), and found the pathway was active, emphasizing the importance of oxidative stress management derived from its activity. This was not surprising as Lee *et al.*<sup>3</sup> demonstrated that the oxygen partial pressure increases rapidly after light appears at dawn. Interestingly, we observed that the most abundant FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE transcript (Bradi2g24090, FBP) was strongly regulated in *Brachypodium* under submergence, up to the remarkable abundance of  $2820 \pm 319$  CPM; in the context of the Calvin cycle, where RUBISCO transcripts were significantly down-regulated, but still present at a range of 525–803 CPM. FBP up-regulation would be a compensatory step under submergence stress.

**Flowering inhibition by submergence stress in *Brachypodium*.** Flowering is inhibited by the ectopic expression of SUB1A-1 in both rice<sup>65</sup> and *Arabidopsis*, through the inhibition of FT and its rice ortholog HD3a<sup>32</sup>, this promotes starch conservation<sup>38</sup>. Interestingly, miRNA5200 targeting FT-like transcripts are also up-regulated under submergence stress in *Brachypodium*<sup>66</sup>. These temporary flowering delay mechanisms are proposed to be an energy-conservation feature of LOQS<sup>32</sup>. This has also been observed in field-grown rice subjected to submergence stress and is better modulated in tolerant SUB1 varieties<sup>3</sup>. In the *Brachypodium* Bd2-3 and Bd21 ecotypes, the heading date was delayed in proportion to the submergence intensity (Supplementary Fig. S5). Higgins *et al.*<sup>67</sup>

reconstructed the flowering pathways in *Brachypodium* and we used this knowledge to explore the *Brachypodium* flowering transcriptome. In addition to the previously found down-regulation of *CO* and *FT*, we also found the down-regulation of *HEME ACTIVATOR PROTEIN 5* (*HAP5A*), a protein that aids in CO-induced *FT* transcription<sup>67</sup> (Supplementary Fig. S5). However, no differences were detected among the ecotypes.

**ERFs-VII transcripts active under submergence stress in *Brachypodium*.** Twenty transcription factors of diverse families (WRKY, ERFs, NACs, HSTF, ABI and ARFs) were commonly up-regulated in both ecotypes and grouped under the category of the DNA-dependent regulation of transcription (GO:0006355; Fig. 2b). Only WRKYs and ERFs have been previously characterized under submergence stress; the first orchestrate the pathogen response<sup>6</sup> and the second control general HCG transcription<sup>10</sup>. Three were labelled as ERFs-VII (Bradi1g72457, Bradi2g11890 and Bradi2g27920). A BLASTP search of the N-terminal amino acids indicated that Bradi1g17960 (Bradi1g17961 in the V.2.0 *Brachypodium* genome) and Bradi1g72450 (not identified in RNA-Seq) were also ERF-VII transcripts.

In *Arabidopsis*, ERFs-VII are divided into two categories: those up-regulated by hypoxic stress (HRE-like) and those constitutively expressed (RAP-like)<sup>23</sup>. N-terminal amino acids of RAP2.12 were used in a BLASTP search and we found that *Brachypodium* has three more ERFs-VII (Bradi3g60120, Bradi1g46690 and Bradi4g31040). The *Brachypodium* ERFs-VII family comprises in total eight genes (Fig. 7).

Since our RNA-Seq experiment was a 2-point collection data set, we quantified mRNA for these genes during the first night (12 h) of stress. In this analysis, we could not detect an ecotype-specific differential expression (Fig. 7a). This leaves the NO/HB-scavenging cycle as the most probable differential mechanism improving the ecotype tolerance in *Brachypodium* at the ERFs-VII protein level.

A manual and MEME-assisted analysis showed that this inducible/constitutive expression was correlated to a low/high domain diversity division (Fig. 7b), which could also be observed through phylogenetic analysis (Fig. 7c). Only Bradi4g31040 – i.e. groups with constitutive ERFs – was still responsive to submergence stress, though not to the extent of inducible ERFs (Fig. 7a). We could not detect a SUB1-like ERF-VII in *Brachypodium* (Fig. 7c), confirming the ecological-niche uniqueness of this gene<sup>68,69</sup>. Knockout studies indicated that constitutive ERFs-VII work as oxygen sensors and early HCG inducers, while inducible ERFs-VII act as late-stress modulators<sup>12,17,23,36</sup>.

There is evidence that ERFs-VII respond to circadian rhythms and dark stress. SUB1A-1 ameliorates dark-stress damage<sup>13</sup> and is expressed at the end of the night, independent of submergence stress<sup>32</sup>; this has also been observed for some ERFs-VII of soybean<sup>18</sup>. The analysis of *Arabidopsis* ERFs-VII transcripts in the DIURNAL transcriptomic database showed that *RAP2.3*, previously considered as a constitutive ERF, is actually highly responsive to the length of the day and has an expression peak at the end of the night. *RAP2.2* is less responsive, but still has an observable oscillation (Supplementary Fig. S6). In *Brachypodium*, we found that Bradi1g72450 was responsive to both submergence and night; interestingly, it was not the gene sharing the most domain types with *RAP2.3* (being Bradi2g27920).

This ERFs-VII toolbox seems to be a common feature of all the plants analysed so far, both mono- and dicotyledonous<sup>15,25,49,42,43,70</sup>. Even though *Brachypodium* is not a plant characteristic of semi-aquatic habitats, small grasses can be subjected to natural submergence stress in the wild (Supplementary Fig. S7).

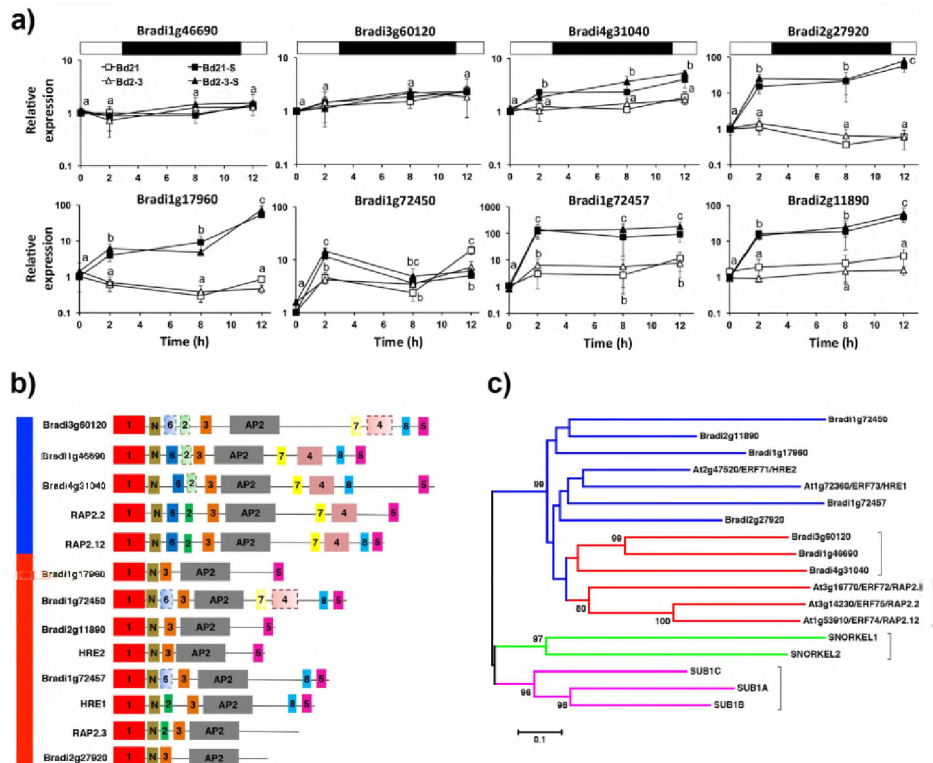
## Conclusions

Hypoxic stress responses are not only of importance for plant development but are also relevant during submergence stress and for the development of plant varieties tolerant to its negative effects. In this research, we aimed to discover physiologically relevant molecular mechanisms, by comparing the transcriptome of genetic materials with contrasting survival traits under submergence stress. By characterizing submergence-tolerant and submergence-sensitive ecotypes of the wild model grass *Brachypodium distachyon*, we found ROS management to be an important characteristic of the tolerant ecotype. This was most likely achieved through an integrated response involving constitutively expressed, induced and down-regulated mechanisms, such as the NO/HB cycle, general antioxidant responses and NR transcript expression, respectively. Transcripts involved in other mechanisms of increased complexity were also differentially expressed, for example transcripts of unknown function, signalling phosphorylation cascades (probably involved in the pathogen response) and the integration of the glyoxylate and TCA cycles. We expect that this information could be used to help design further experimentation aimed at expanding our current knowledge of physiological responses, with relevance for plant breeding programmes of submergence-tolerant crop cultivars.

## Methods

**Brachypodium ecotypes.** Seeds of *Brachypodium distachyon* ecotypes Bd21, Bd2-3, Bd-1-1 and Tek10 were obtained from Professor David Garvin at the United States Department of Agriculture (USDA). For all the experiments, the seeds were disinfected in 10 mL of 1:1 household bleach (sodium hypochlorite 1.6%) and one volume of distilled, deionized and autoclaved water (ddH<sub>2</sub>O), rinsed five times in 20 mL of ddH<sub>2</sub>O, scarified in water for 4 d at 4 °C and sown horizontally in substrate (Sunshine Mix #3 plus 1:4 v/v perlite:substrate, autoclaved for 2 h and finally mixed with 2% w/w slow liberation fertilizer NPK 15:15:17; Nitrofoska). Germination and growth were carried out under long-day conditions (16 h light/8 h dark, 180 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 50% humidity) in a growth room, with irrigation every 2 d using filtered tap water.

**Submergence stress.** *Brachypodium* plants (14-day-old, 6 leaves stage) were submerged in 30-cm deep water columns, inside opaque-walled plastic tanks. Light still reached the plants at 70 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The ecotypes were submerged side-by-side in a randomized manner; only plants submerged in the same tank were compared. Controls were grown in plastic tanks without submergence. Submergence stress started at ZT13 (3 h before night)



**Figure 7. Characterization of *Brachypodium distachyon* group VII ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS transcriptionally active during submergence stress.** (a) Transcript dynamics during the first 12 h of submergence stress of ERFs-VII transcripts is indicated. qPCR was used and the constitutive gene was *UBIQUITIN* (Bradi1g32860). Bd21 control at time 0 was selected as the relative expression (=1). The white and black symbols indicate the control and submergence stress treatments, respectively. Data are the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments with two technical repeats; letters indicate differences between the ecotypes and submergence times indicated (two-way ANOVA, P-value < 0.05). No statistical differences were detected among the ecotypes. (b) Domain architecture of *Brachypodium* ERFs-VII following previously published motifs<sup>15</sup>. The blue and red bars indicate constitutive and inducible expression during submergence stress. (c) Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of *Arabidopsis*, *Brachypodium* and rice *SUB1* and *SNORKEL* ERFs-VII. The blue and red bars indicate inducible and constitutive expression during submergence stress. The numbers are bootstrap values after 1000 replicates ( $\geq 80$ ).

and the plants were removed by gentle subtraction from the water column and left to grow under normal conditions for the time indicated in each experiment. At the times indicated in each experiment, we registered the number of leaves, height, tillers, time to heading and percentage of surviving individuals; only the latter proved useful to quantify submergence stress tolerance, as 50% Lethal Time (LT<sub>50</sub>; using the on-line tool IC50; <http://ic50.tk>).

**RNA-Seq.** *Brachypodium* ecotypes with contrasting submergence tolerance were subjected to a 48 h submergence stress, as detailed in the previous section. Above-ground tissue was collected immediately in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in an ultra-freezer, until further processing. Tissue was ground to powder with a mortar and pestle with liquid nitrogen, avoiding thawing. Control and submerged total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, 15596018), purified with Direct-zol RNA mini prep columns (Zymo Research, R2050) and digested in-column with DNase I (ThermoScientific, #EN0521). RNA integrity and concentrations were verified in denaturing 1.0% agarose gel, a Nanodrop 2000 (ThermoScientific) and in a Bioanalyzer 2100 (Agilent), with the integrated software 2100 Expert. Samples had an RNA Integrity Number (RIN) between 6.4 and 7.2, characteristic of aerial plant tissue<sup>71</sup>. Total RNA extracted from the control and submerged tissue from three independent experiments, each consisting of five individual plants, were used to construct cDNA indexed libraries

and sequenced in a HiSeq2500 (Illumina) at 1 × 50 format, making a total of 12 sequenced libraries (tolerant and intolerant ecotypes, control and submerged, experimental triplicates) in a 2-lane format. RNA integrity, library construction and sequencing were performed as a service at the Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM; <http://www.uusmd.unam.mx>).

**Bioinformatics analysis.** Sequences were processed using the following pipelines. For base calling, Illumina Casava 1.7 software was employed and the sequenced reads were trimmed of their adaptor sequences using Trimmomatic<sup>72</sup>, and then mapped to the *Brachypodium distachyon* ecotype Bd21 genome (Bdistachyon\_283\_v2.0; downloaded from <http://genome.jgi.doe.gov>) using TopHat2 with parameters -p 4 —library-type fr-firststrand. Reads aligned to genomic regions were counted using the HTSeq library<sup>73</sup>. The analyses of differentially expressed genes were performed in the R environment, using the edgeR package with a GLM (generalized linear model) and a false discovery rate < 0.05 (FDR). Tables with CPM for all the gene models and results for the differential expression analysis were built (Supplementary Table S2). To group differentially expressed transcripts, a Logarithmic Fold Change (Log<sub>2</sub>FC) value ≥ 1.5 (up-regulated) or ≤ -1.5 (down-regulated) and a FDR < 0.05 × 10<sup>-5</sup> were considered. GO analysis of these differential transcripts was performed at phytozome.jgi.doe.gov.

**Quantitative PCR.** RNA was extracted from aerial tissue collected from five individuals of three new independent experiments with the Direct-zol RNA miniprep kit (Zymo Research, R2050) and digested with the included DNase I in a column. Total RNA (2.1 µg) was used to synthesize cDNA using the Maxima First Strand cDNA kit (ThermoScientific, K1642). Quantitative PCR was performed in a Piko Real 96 thermocycler (ThermoScientific) using SYBR Green qPCR Master Mix 2× (ThermoScientific, K0251) and 1 µL of 1:10 cDNA dilution (20 µL final volume). Primers were designed using on-line tools at [www.idt.com](http://www.idt.com) (IDT), with sequences downloaded from phytozome.jgi.doe.gov and synthesized by Macrogen. The efficiency was determined in 1:4, 1:6, 1:64 and 1:256 cDNA dilutions using the integrated thermocycler software (Supplementary Table S6).

**ROS staining.** Samples were collected after 24 h of submergence stress. Two stain methods were used: nitrobluetrazolium (NBT) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB), detecting superoxide and hydrogen peroxide, respectively<sup>8</sup>. For NBT staining, the leaves were immersed in 25 mL of an NBT solution (0.5 µg/mL) in phosphate buffer (10 mM, pH 7.6) for 3 h in a rocking bed and protected from light. For DAB, the leaves were immersed in 25 mL of a DAB solution (1 µg/mL) in tris-acetate buffer (50 mM, pH 5.0) for 8 h in a rocking bed. After staining, the treatments were boiled in ethanol 95% (v/v) for 30 min; the ethanol was then decanted and the leaves were left immersed in glycerol (40%) in a rocking bed for 16 h and then photographed.

**Phylogenetic tree and domain analysis.** Phylogenetic relations between the indicated ERFs-VII were performed with MEGA 6.0 software for the Mac<sup>74</sup>. Full-length amino acid coding regions were downloaded at NCBI from previous reports<sup>23,33,35</sup>, aligned using MUSCLE and then a phylogenetic tree was built by the neighbour-joining method (Poisson correction, pairwise deletion of gaps). Domain analysis was performed manually and MEME-assisted<sup>75</sup> following the models published for *Arabidopsis*<sup>15</sup>.

## References

- Bailey-Serres, J., Lee, S. C. & Brinton, E. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* **160**, 1698–1709 (2012).
- Voisenek, L. A. C. J. & Bailey-Serres, J. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytol.* **206**, 57–73 (2015).
- Singh, U. S. *et al.* Field performance, dissemination, impact and tracking of submergence tolerant (Sub1) rice varieties in South Asia. *SABRAO J. Breed. Genet.* **45**, 112–131 (2013).
- Saldaña Zorrilla, S. O. Stakeholders' views in reducing rural vulnerability to natural disasters in Southern Mexico: hazard exposure and coping and adaptive capacity. *Global Environ. Change* **18**, 583–597 (2008).
- Lee, S. C. *et al.* Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytol.* **190**, 457–471 (2011).
- Hsu, F.-C. *et al.* Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 2699–2713 (2013).
- van Zanten, M., Pons, T. L., Janssen, J. A. M., Voisenek, L. A. C. J. & Peeters, A. J. M. On the relevance and control of leaf angle. *Crit. Rev. Plant Sci.* **29**, 300–316 (2010).
- Fukao, T., Yeung, E. & Bailey-Serres, J. The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *Plant Cell* **23**, 412–427 (2011).
- Gibbs, D. J. *et al.* Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Mol. Cell* **53**, 369–379 (2014).
- van Dongen, J. T. & Licausi, F. Oxygen sensing and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 345–67 (2015).
- Peña-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, B. E., Fernández-Linares, L., Ruiz-Medrano, R. & Xocoostle-Cazares, B. Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. *Plant Sci.* **170**, 724–731 (2006).
- Papdi, C. *et al.* The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the Ethylene Response Factor-VII genes RAP2.12, RAP2.2 and RAP2.3. *Plant J.* **82**, 772–784 (2015).
- 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.* **160**, 1795–1807 (2012).
- Gibbs, D. J. *et al.* Group VII ethylene response factors coordinate oxygen and nitric oxide signal transduction and stress responses in plants. *Plant Physiol.* **169**, 23–31 (2015).
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* **140**, 411–432 (2006).
- Gibbs, D. J. *et al.* Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479**, 415–418 (2011).
- Licausi, F. *et al.* Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**, 419–422 (2011).
- Weiss, D. A. *et al.* Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Comm.* **5**, 3425 (2014).

19. Mustroph, A. *et al.* Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiol.* **152**, 1484–1500 (2010).
20. Narsai, R., Rocha, M., Geigenberger, P., Whelan, J. & van Dongen, J. T. Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *New Phytol.* **190**, 472–487 (2011).
21. Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J. & Bailey-Serres, J. Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E203–E212 (2014).
22. Giuntoli, B. *et al.* A trihelix DNA binding protein counterbalances hypoxia-responsive transcriptional activation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* **12**, e1001950 (2014).
23. Licausi, F. *et al.* HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **62**, 302–315 (2010).
24. Polko, J. K. *et al.* Ethylene-Mediated Regulation of A2-Type CYCLINs Modulates Hypoosmotic Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **169**, 194–208 (2015).
25. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO Statistical Yearbook*, p. 307. (FAO, 2013).
26. Bailey-Serres, J. *et al.* Submergence tolerant rice: SUB1's journey from landrace to modern cultivar. *Rice* **3**, 138–147 (2010).
27. Mendiondo, G. M. *et al.* Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase *PROTEOLYSIS6*. *Plant Biotech. J.* **14**, 40–50 (2016).
28. Campbell, M. T. *et al.* Genetic and molecular characterization of submergence response identifies *Sub1a* as a major submergence tolerance locus in Maize. *PLoS One* **10**, e0120385 (2015).
29. Setter, T. L. *et al.* Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India: the importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. *Ann. Bot.* **103**, 221–235 (2009).
30. Gomathi, R., Gururaja, P. N., Chandran, K. & Selvi, A. Adaptive responses of sugarcane to waterlogging stress: an overview. *Sugar Tech.* **17**, 325–338 (2015).
31. Xu, K. *et al.* Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**, 705–708 (2006).
32. Peña-Castro, J. M. *et al.* Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence-tolerance mechanism. *Plant J.* **67**, 434–446 (2011).
33. Fukao, T., Xu, K., Ronald, P. C. & Bailey-Serres, J. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* **18**, 2021–2034 (2006).
34. Jung, K. H. *et al.* The submergence tolerance regulator Sub1A mediates stress-responsive expression of AP2/ERF transcription factors. *Plant Physiol.* **152**, 1674–1692 (2010).
35. Hartori, Y. *et al.* The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460**, 1026–1030 (2009).
36. Kretschmar, T. *et al.* A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice. *Nat. Plants* **1**, 15124 (2015).
37. Septiningsih, E. M. *et al.* Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond. *Ann. Bot.* **103**, 151–160 (2009).
38. Núñez-López, L., Aguirre-Cruz, A., Barrera-Figueroa, B. E. & Peña-Castro, J. M. Improvement of enzymatic saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* by ectopic expression of the rice SUB1A-1 transcription factor. *PeerJ* **3**, e817 (2015).
39. Vashist, D. *et al.* Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *New Phytol.* **190**, 299–310 (2011).
40. Niroula, R. K. *et al.* SUB1A-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species. *Plant J.* **72**, 282–293 (2012).
41. Sasicharan, R. *et al.* Root transcript profiling of two *Rorippa* species reveals gene clusters associated with extreme submergence tolerance. *Plant Physiol.* **163**, 1277–1292 (2013).
42. van Veen, H. *et al.* Group VII Ethylene Response Factor diversification and regulation in four species from flood-prone environments. *Plant Cell Environ.* **37**, 2421–2432 (2014).
43. van Veen, H. *et al.* Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *Plant Cell* **25**, 4691–4707 (2013).
44. The International Brachypodium Initiative (IBI). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463**, 763–768 (2010).
45. Luo, N., Liu, J., Yu, X. & Jiang, Y. Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiol. Plant.* **141**, 19–29 (2011).
46. Schwartz, C. J. *et al.* Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenergy Res.* **3**, 38–46 (2010).
47. Xie, L. J. *et al.* Arabidopsis acyl-CoA-binding protein ACBP3 participates in plant response to hypoxia by modulating very-long-chain fatty acid metabolism. *Plant J.* **81**, 53–67 (2015).
48. Syed, N. H. *et al.* Core clock, SUB1, and ABAR genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. *J. Exp. Bot.* **66**, 7129–7149 (2015).
49. Tamang, B. G., Magliozzi, J. O., Maroof, M. A. S. & Fukao, T. Physiological and transcriptomic characterization of submergence and reoxygenation responses in soybean seedlings. *Plant Cell Environ.* **37**, 2350–2365 (2014).
50. Ortiz-Marchena, M. I. *et al.* Photoperiodic control of carbon distribution during the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 565–584 (2014).
51. Smith, S. M. *et al.* Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **136**, 2687–2699 (2004).
52. Vanlerberghe, G. C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6805–6847 (2013).
53. Mialandi, M. V. *et al.* The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants. *FEBS J.* **278**, 47–481 (2011).
54. Hill, R. D. Non-symbiotic haemoglobins - What's happening beyond nitric oxide scavenging? *AoB Plants* **2012**, pls004 (2012).
55. Gupta, K. J. *et al.* Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *J. Exp. Bot.* **63**, 1773–1784 (2012).
56. Bul, I. T., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S. & Licausi, F. Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **236**, 37–43 (2015).
57. Narsai, R. & Whelan, J. How unique is the low oxygen response? An analysis of the anaerobic response during germination and comparison with abiotic stress in rice and *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **4**, 349 (2013).
58. Miyakawa, T. *et al.* A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity. *Plant Physiol.* **166**, 766–778 (2014).
59. Wrzaczek, M. *et al.* Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of Receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **10**, 95 (2010).
60. Atwell, B. J., Greenway, H. & Colmer, T. D. Efficient use of energy in anoxia-tolerant plants with focus on germinating rice seedlings. *New Phytol.* **206**, 36–56 (2015).
61. Barding, G. A., Fukao, T., Béni, S., Bailey-Serres, J. & Larive, C. K. Differential metabolic regulation governed by the rice SUB1A gene during submergence stress and identification of alanylglycine by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.* **11**, 320–330 (2012).

62. Barding, G. A., Béni, S., Fukao, T., Bailey-Serres, J. & Larive, C. K. Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *J. Proteome Res.* **12**, 898–909 (2013).
63. Branco-Price, C., Kaiser, K. A., Jang, C. J. H., Larive, C. K. & Bailey-Serres, J. Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **56**, 743–755 (2008).
64. Miro, B. & Ismail, A. M. Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Front. Plant Sci.* **4**, 269 (2013).
65. Fukao, T. & Bailey-Serres, J. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16814–16819 (2008).
66. Jeong, D. H. *et al.* Parallel analysis of RNA ends enhances global investigation of microRNAs and target RNAs of *Brachypodium distachyon*. *Genome Biol.* **14**, R145 (2013).
67. Higgins, J. A., Bailey, P. C. & Laurie, D. A. Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate grasses. *PLoS One* **5**, e10065 (2010).
68. Fukao, T., Harris, T. & Bailey-Serres, J. Evolutionary analysis of the Sub1 gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice. *Ann. Bot.* **103**, 143–150 (2008).
69. Pucciarrello, C. & Perata, P. Quiescence in rice submergence tolerance: an evolutionary hypothesis. *Trends Plant Sci.* **18**, 377–381 (2013).
70. Juntawong, P. *et al.* Elucidation of the molecular responses to waterlogging in *Jatropha* roots by transcriptome profiling. *Front. Plant Sci.* **5**, 658 (2014).
71. 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> (Accessed: 21st April 2016).
72. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
73. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
74. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729 (2013).
75. Bailey, T. *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucl. Acid. Res.* **37**, W202–W208 (2009).

### Acknowledgements

We wish to thank Dr. José Abad, Dra. Sandra del Moral and Eng. Juan Hernández (UNPA-Tuxtepec) for sharing equipment and reagents, Ms. Fabiola Hernández (UNPA-Tuxtepec) for administrative assistance, Dr. Ricardo Grande (IBT-UNAM) for advise and performing RNA-Seq, and Prof. David Garvin (USDA) for the *Brachypodium* seeds used in this study. This research was funded by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - Secretaría de Educación Pública de México para Jóvenes Investigadores Ciencia Básica (152642 to Julián Mario Peña-Castro, 169619 to Blanca Estela Barrera-Figueroa, 183958 to Jacqueline Capataz-Tafur) and Faculty of Science, Kasetsart University (RFG1-3) to Piyada Juntawong. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología granted to Irma Karla Rivera-Contreras a postgraduate (Beca Nacional 296916) and a research fellowship (Mujeres Indígenas) and to Teresa Zamora-Hernández a graduate (21776) and postgraduate fellowship (586510).

### Author Contributions

J.M.P.-C. and P.J. designed and analysed the experiments and wrote the manuscript, I.K.R.-C., T.Z.-H. and A.A.H.-H. carried out laboratory work and data analysis, J.C.-T. and B.E.B.-F. contributed with materials and equipment, interpreting the data, planning the experiments and editing the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

### Additional Information

**Accession codes:** GEO submission GSE74222.

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Rivera-Contreras, I. K. *et al.* Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Sci. Rep.* **6**, 27686; doi: 10.1038/srep27686 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>