

# Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

---

---

## TESIS

### Caracterización fisiológica y molecular de la floración en *Brachypodium distachyon* bajo estrés por déficit hídrico

Que para obtener el grado de:

**Maestría en Biotecnología**

**PRESENTA:**

Mariana Esther Cesario Solis

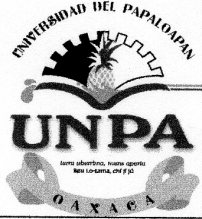
**Asesora de Tesis:**

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

**Co-Asesor de Tesis:**

Dr. Julián Mario Peña Castro

Tuxtepec Oaxaca, Septiembre de 2015



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tuxtepec, Oaxaca a 24 de Marzo de 2015

**Ing. Mariana Esther Cesario Solís**  
Estudiante de la Maestría en Biotecnología  
Universidad del Papaloapan

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

Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura	UNPA	Presidente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	UNPA	Vocal
Dr. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Secretario
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo	UNPA	1er Suplente
Dr. Edgar García López	UNPA	2o Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente



**Dr. Guillermo Ramírez Galicia**  
Jefe de la División de Estudios de  
Posgrado

Ccp Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Asesor  
Ccp Dr. Julián Mario Peña Castro, Co-asesor  
Ccp LP Yesenia Barrientos Arenal, Jefa de Servicios Escolares  
Ccp Archivo



**M en C. Héctor López Arjona**  
Vice-rector Académico / VICE-RECTORIA  
VoBo ACADEMICA

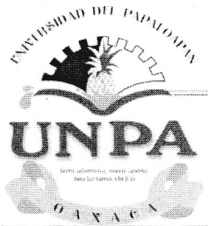
CAMPUS TUXTEPEC

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

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 25 de Agosto de 2015

LP 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 Maestro en Biotecnología de la Ing. Mariana Esther Cesario Solís, matrícula 12140015, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título “**Caracterización fisiológica y molecular de la floración en *Brachypodium distachyon* bajo estrés por déficit hídrico**” para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular me despidio quedando atento ante cualquier duda o aclaración.

Atentamente,



Dr. Mario Valera Zaragoza  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado  
[mvalera@unpa.edu.mx](mailto:mvalera@unpa.edu.mx), [mario\\_valzar@hotmail.com](mailto:mario_valzar@hotmail.com)

Ccp. Ing. Mariana Esther Cesario Solís  
Ccp. 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 de la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y la codirección del Dr. Julián Mario Peña Castro, con el apoyo del Programa de Mejoramiento del Profesorado a través del proyecto PROMEP 2011 103.5/11/6720 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de los proyectos de Ciencia Básica CONACYT 169619 y 152643.

**Partes de este trabajo se presentaron como poster en el XXX Congreso Nacional de Bioquímica, realizado en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco, del 2 al 8 de noviembre de 2014.**

**Mariana E. Cesario Solís**, Amado Ortiz Yescas, Julián M. Peña Castro, Blanca E. Barrera Figueroa, 2014. Physiological and molecular characterization of the response to drought in four *Brachypodium distachyon* natural variants.

Amado Ortiz-Yescas, **Mariana E. Cesario-Solis**, Julián M. Peña-Castro, Blanca E. Barrera-Figueroa, 2014. Identification of microRNAs responsive to chronic drought, during three growth stages of *Brachypodium distachyon* Bd21.

## DEDICATORIA

*A Dios por haberme dado la vida y me permitido llegar hasta este momento tan especial en mi existencia. Por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.*

*Con mucho cariño principalmente a mi madre María Esther Solis Lugo y a mi padre Saúl Cesario Avilés que me concibieron y han estado conmigo en todo momento por creer en mí, por todos los sacrificios que hicieron por mí a lo largo de mi maestría, por ser un ejemplo hacia mi persona, por su cariño, por mostrarme como ser una mujer de bien, por el tiempo constante e incondicional que me ha dedicado jugando el papel de padres, por el gran esfuerzo dedicado para poder sacarme adelante. Gracias papas. Sin ustedes no lo hubiese podido hacer realidad este sueño.*

*A mis hermanos Saúl Daniel Cesario Solis y Kevin Josué Careaga Solis, por su compañía y por formar parte de mi vida por el apoyo que siempre me brindaron día con día en el transcurso de cada año de esta maestría.*

*A mi amado Luis Gerardo Sarmiento López, por ser parte importante en el logro de mis metas profesionales. Gratitudes por haber sido fuente de inspiración. Por brindarme de amor, cariño, estímulo y su apoyo constante. ¡Gracias! Por tu cariño, comprensión, paciencia y espera para que pudiera terminar el grado, son evidencia de tu gran amor. Porque mis éxitos también son tuyos.*

*A mi querido Hachi el amigo más fiel que he conocido en toda mi vida, con el cual pase unos momentos difíciles de mi existencia y que logre superar con el amor incondicional que él me dio. Un amigo que se alegraba con mis llegadas y se quedaba triste con mi partida, un amigo que me lamía cuando llegaba triste y cabizbaja, por no haber obtenido resultados buenos en mis experimentos, con el cual solía pasear y jugar conmigo haciéndome olvidar ese mal día.*

*A mis hermanitos Karina Osorio Ramírez y Alejandro Cruz Hernández, que aunque no son hermanos de Sangre son parte de mi existencia y con los cuales he compartido diversas etapas importantes de vida.*

*A mis amigas, que gracias al equipo que formamos llegamos logramos llegar hasta el final del camino y que hasta el momento, seguimos siendo amigas y el club de las Ms: Monserrat Desgarennes Alcalá, Marlen Gómez Montalvo y Sandra Edith Jiménez.*

*A mis amigos(as) de trabajo de los laboratorios de biotecnología vegetal (Karla Rivera, mis hermano Amado Yescas, Francisco Pulido y Oscar Ramírez) con los que compartí logros y frustraciones durante la realización de este trabajo a mis compañeros de biología molecular por estar siempre en armonía grupal y convivencia. Gracias compañeros y amigos.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, por la oportunidad que me otorgó para trabajar a su lado, por la confianza que depositó en mí para afrontar cada una de las adversidades durante mi estancia, por sus consejos, por su paciencia, dedicación y por los conocimientos transmitidos en este camino de aprendizaje.*

*Al Dr. Julián Peña Castro, por sus aportes en este trabajo, sus consejos, correcciones y por la confianza brindada para hacer mejor el trabajo y más grata mi estancia en la UNPA.*

*A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur y el Dr. Paul Sánchez Ocampo por su apoyo y confianza depositada en mí, por haberme abierto las puertas de su casa incondicionalmente. ¡Muchas gracias!*

*A la Dra. Sandra Del Moral y la Dra. Ariana Huerta, por sus consejos, comentarios y aportes en el presente trabajo.*

*A la Universidad del Papaloapan, que a través de su División de Estudios de Posgrado proporcionó el ambiente académico para mi superación profesional. Con agradecimiento especial al Dr. Guillermo por su paciencia y el tiempo dedicado a atender los asuntos del posgrado.*

*Al CONACYT, por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado, a través de la Beca Nacional 349976 y la Beca del Programa de Fortalecimiento Académico para Indígenas 2013.*

*A mis amigas y amigos de la Maestría en Biotecnología, con los cuales pase nuevos momentos durante esta etapa, donde tuve la oportunidad de conocerlos y crear nuevas amistades.*



## INDICE

**Página**

<b>RESUMEN</b>	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>II. ANTECEDENTES</b>	4
2.1 El ciclo de vida de las plantas.....	4
2.2 La floración.....	5
2.2.1 Ruta del fotoperiodo.....	6
2.2.2 Ruta de la vernalización.....	9
2.2.3 Ruta autónoma.....	10
2.2.4 Ruta del ácido giberélico.....	10
2.2.5 Ruta de la maduración o "aging".....	11
2.3 Integración de las rutas de floración.....	12
2.4 Influencia de otros factores sobre el tiempo a floración.....	12
2.5 La sequía y las plantas.....	13
2.6 Mecanismos generales de respuesta a la sequía.....	14
2.7 La sequía y la plasticidad en las plantas.....	16
2.8 <i>Brachypodium distachyon</i> como modelo de estudio.....	18
2.8.1 Ciclo de vida y etapas fenológicas de <i>B. distachyon</i> .....	20
2.9 Variación natural de la respuesta a sequía y del tiempo a floración en <i>B. distachyon</i> .....	23
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	24
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	26
<b>V. OBJETIVOS</b>	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos específicos.....	26
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
6.1 Líneas de <i>Brachypodium distachyon</i> .....	28
6.2 Germinación y obtención de nuevas semillas de variantes de <i>B. distachyon</i> .....	28
6.3 Etapa 1. Establecimiento del cultivo de <i>B. distachyon</i> en condiciones óptimas..	29
6.3.1 Determinación de la intensidad de luz adecuada para el cultivo de <i>B. distachyon</i> .....	29
6.3.2 Identificación de las etapas de crecimiento de <i>B. distachyon</i> y perfil temporal de desarrollo.....	30
6.4 Etapa 2. Evaluación fisiológica del estrés por déficit hídrico en 4 variedades de <i>B. distachyon</i> .....	30
6.4.1 Diseño de los ensayos y condiciones de crecimiento.....	30
6.4.2 Tratamientos de estrés.....	31
6.4.3 Medición de parámetros de crecimiento, balance de agua y producción de semillas.....	32
6.4.3.1 Número de hojas, ramificaciones y altura de la planta.....	32
6.4.3.2 Contenido relativo de agua en hojas.....	33
6.4.3.3 Tiempo a floración y número de inflorescencias y semillas.....	34

6.5 Etapa 3. Análisis molecular.....	34
6.5.1 Diseño de los ensayos y condiciones de crecimiento.....	36
6.5.2 Tratamientos y medición de parámetros de crecimiento y de estrés.....	34
6.5.3 Recolección de tejidos para el análisis molecular.....	35
6.5.4. Caracterización molecular.....	36
6.5.4.1 Extracción de RNA.....	36
6.5.4.2 Cuantificación y análisis de la pureza e integridad del RNA.....	37
6.5.4.3 Tratamiento con DNasa.....	37
6.5.4.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	38
6.5.4.5 Análisis de la expresión de genes de floración mediante PCR cuantitativa.....	39
6.6 Análisis estadístico.....	41
<b>VII. RESULTADOS</b>	
7.1 Etapa 1. Determinación de condiciones óptimas de crecimiento.....	42
7.1.1 Efecto de la intensidad de luz blanca sobre el crecimiento de <i>B. distachyon</i> .....	42
7.1.2 Perfil temporal de desarrollo de variantes de <i>B. distachyon</i> .....	44
7.2 Etapa 2. Evaluación fisiológica.....	46
7.2.1 Efectos generales del estrés hídrico sobre variantes de <i>B. distachyon</i> .....	46
7.2.2. Efectos del estrés sobre parámetros de crecimiento.....	47
7.2.2.1 Variante Bd21.....	47
7.2.2.2 Variante Bd1-1.....	49
7.2.2.3 Variante Bd2-3.....	49
7.2.2.4 Variante Tek10.....	49
7.2.3. Efectos del estrés sobre el balance de agua.....	53
7.2.3.1. Contenido de agua en suelo y consumo de agua.....	53
7.2.3.2 Contenido relativo de agua en hojas.....	57
7.2.4. Efectos del estrés sobre el tiempo a floración y la producción de inflorescencias y semillas.....	58
7.3 Etapa 3. Análisis molecular.....	66
7.3.1 Caracterización de las muestras empleadas en el análisis molecular.....	66
7.3.2 Análisis de expresión de <i>GIGANTEA (GI)</i> y <i>SOC1</i> .....	69
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	72
8.1 Condiciones adecuadas para el desarrollo de <i>B. distachyon</i> .....	72
8.2 Variación natural de la duración del ciclo de vida en <i>B. distachyon</i> .....	72
8.3 Ajustes fisiológicos inducidos por la sequía en variantes naturales de <i>B. distachyon</i> .....	72
8.4 Administración del agua en <i>B. distachyon</i> durante el estrés por sequía.....	75
8.5 Plasticidad del tiempo a floración inducida por sequía en <i>B. distachyon</i> .....	76
8.6 Efecto de la sequía en la productividad de semillas de <i>B. distachyon</i> .....	77
8.7 Expresión de <i>GIGANTEA</i> y <i>SOC1</i> en <i>B. distachyon</i> bajo estrés por sequía.....	79

<b>IX. CONCLUSIONES</b>	81
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	82
<b>XI. REFERENCIAS</b>	83
APÉNDICE A. Preparación de soluciones empleadas en este trabajo.....	88
APÉNDICE B. Extracción de RNA con Trizol.....	92
APÉNDICE C. Diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen <i>SOCI</i> .....	93

### **INDICE DE TABLAS**

	<b>Página</b>
Tabla 1. Variantes naturales de <i>Brachypodium distachyon</i> empleadas en este estudio.....	28
Tabla 2. Tratamientos de intensidad de luz empleados en este trabajo.....	29
Tabla 3: Tratamientos de sequía aplicados a las variantes de <i>B. distachyon</i> .....	31
Tabla 4. Preparación de reacciones de síntesis de DNA complementario.....	38
Tabla 5. Programa de síntesis de DNA complementario.....	38
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	43
Tabla 7. Preparación de reacciones de qPCR con SYBRGreen.....	38
Tabla 8. Programa de ciclado para qPCR con SYBRGreen.....	40
Tabla 9. Porcentaje de reducción en parámetros de crecimiento.....	52
Tabla 10. Porcentaje de consumo de agua de 4 variantes naturales de <i>B. distachyon</i> bajo 4 tratamientos.....	56
Tabla 11. Producción de semillas las variantes de <i>B. distachyon</i> bajo diferentes condiciones de sequía.....	65
Tabla 12. Parámetros fisiológicos de desarrollo en <i>B. distachyon</i> Bd21 bajo dos fotoperiodos.....	68

## INDICE DE FIGURAS

**Página**

Figura 1. Factores ambientales (endógenos) e internos (exógenos) que determinan las rutas de floración en plantas.....	6
Figura 2. Integración de las rutas de floración.....	8
Figura 3. Estrategias generales de respuesta al déficit hídrico en plantas.....	15
Figura 4. Plasticidad en el tiempo a floración en respuesta al estrés por sequía.....	17
Figura 5. Relaciones filogenéticas de <i>B. distachyon</i> con otros pastos.....	19
Figura 6. Ciclo de vida de <i>B. distachyon</i> .....	22
Figura 7. Diagrama general de trabajo. Estrategia experimental en 3 etapas.....	27
Figura 8. Medición de parámetros fisiológicos de desarrollo en <i>B. distachyon</i> .....	33
Figura 9. Cronograma de colecta de muestras para el análisis molecular.....	35
Figura 10. Efecto de la intensidad de luz en el crecimiento de tres variantes de <i>B. distachyon</i> .....	42
Figura 11. Respuesta a la intensidad de luz en las distintas variantes de <i>B. distachyon</i> .....	43
Figura 12. Perfil temporal de crecimiento de <i>B. distachyon</i> .....	45
Figura 13. Distribución del ciclo de vida de las variantes de <i>B. distachyon</i> en 4 etapas.....	46
Figura 14. Efecto del déficit en el desarrollo de cuatro variantes de <i>B. distachyon</i> .....	48
Figura 15. Respuesta fisiológica al estrés por sequía durante 4 etapas del desarrollo de <i>B. distachyon</i> .....	50
Figura 16. Consumo de agua diario de cuatro variantes de <i>B. distachyon</i> .....	54
Figura 17. Contenido relativo de agua en hojas de 4 variantes de <i>B. distachyon</i> .....	58
Figura 18. Distribución de tiempo a floración de las variantes .....	60
Figura 19. Aspecto de inflorescencias secas de las 4 variantes de <i>B. distachyon</i> .....	62
Figura 20. Producción de inflorescencias en 4 variantes de <i>B. distachyon</i> .....	62
Figura 21. Porcentaje de inflorescencias en las variantes de <i>B. distachyon</i> .....	63
Figura 22. Semillas de <i>B. distachyon</i> de las variantes .....	64
Figura 23. Rendimiento de semillas en las variantes de <i>B. distachyon</i> .....	65
Figura 24. Contenido relativo en hojas (CRAh) con diferentes condiciones.....	67
Figura 25. <i>B. distachyon</i> Bd21 en la proximidad de la transición a la floración.....	67
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% desnaturalizante, de RNAs totales extraídos de <i>B. distachyon</i> .....	69
Figura 27. Cinética de expresión de <i>GI</i> y <i>SOC1</i> en condiciones control y de sequía bajo dos fotoperiodos.....	71

## ABREVIATURAS

Símbolo	Significado
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
GA	Ácido giberélico
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. sativa</i>	<i>Avena sativa</i>
<i>B. distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
<i>B. rapa</i>	<i>Brassica rapa</i>
cm	Centímetros
DEPC	Dietilpirocarbonato
GI	Gigantea
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Horas
m <sup>2</sup>	metros cuadrados
L	Litros
m	Metros
Mi.RNA	MicroRNA
μL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
nM	Nanomolar
No.	Número
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
qPCR	PCR cuantitativa
PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
S1	Sequía leve
S2	Sequia moderada
S3	Sequia severa
T	Temperatura
ZT	Tiempo Zeitgeber

## **RESUMEN**

## RESUMEN

La transición de la fase vegetativa a reproductiva es un paso delicado del ciclo de vida de las plantas que puede afectarse por el déficit de agua. La sequía puede retrasar o adelantar la floración; esto último se conoce como respuesta de escape.

*Brachypodium distachyon* es un nuevo modelo vegetal con alto potencial para estudiar la plasticidad en el tiempo a floración en respuesta al déficit hídrico, debido a su gran diversidad de variantes naturales. En este trabajo se realizó un estudio de 4 variantes naturales de *B. distachyon* que contrastan en tolerancia a la sequía y tiempo a floración: Bd21 y Bd2-3 (baja tolerancia, floración temprana) y Bd1-1 y Tek-10 (alta tolerancia, floración tardía). Las cuatro variantes se cultivaron bajo condiciones controladas (23°C, 20 h / 4h de luz / oscuridad fotoperiodo), en tratamiento de riego normal (100% de capacidad de retención de agua) y tres niveles de sequía: moderada (60%), intermedia (40%), y severa (30%). Con el fin de inducir un estado crónico de la sequía, el agua se mantuvo a estos niveles a lo largo del ciclo de vida de la planta.

De acuerdo a los resultados, fue posible observar que en *B. distachyon* el estrés por sequía modifica características fisiológicas y morfológicas en todas las variantes estudiadas, en función del nivel de estrés aplicado. El estrés hídrico moderado e intermedio indujo la respuesta de escape en las variantes Bd2-3, Bd1-1 y Tek10, mientras que la variante Bd21 mostró un ligero retraso en la floración. En la mayoría de los casos, el estrés grave causó floración tardía, baja producción de semillas e incluso daño irreversible. Las variantes Bd1-1 y Tek10 produjeron el menor número de semillas en condiciones control, pero en contraste, el estrés favoreció la formación de semillas en estas variantes. Mediante PCR cuantitativa se investigó en *B. distachyon* Bd21 el perfil de expresión del gen *GIGANTEA (GI)*, un gen clave en la regulación de la floración ante condiciones de estrés, en una cinética de 48 h. Este gen ha sido asociado previamente a la respuesta de escape a la sequía. Sin embargo, en Bd21, cuya floración no se adelanta, los transcritos de *GI* se acumulan en respuesta al estrés. Adicionalmente, se analizó la expresión del gen *SOC1*, que juega un papel clave en la regulación del tiempo a floración y actúa río abajo de *GI*. Se observó que en general *SOC1* no aumenta su expresión en respuesta al estrés, lo que apoya el fenotipo de floración atrasada en Bd21. Esto sugiere que *GI* podría tener un papel más general para controlar otro tipo de respuestas al estrés hídrico que no necesariamente culminan en el escape a la sequía. Los resultados de este trabajo confirman el potencial de *B. distachyon* como planta modelo para ampliar el conocimiento de los mecanismos de respuesta al estrés, cuyos efectos implican ajustes en el patrón de desarrollo que inciden positiva o negativamente en la producción de semillas.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La sequía se considera como el factor más crítico que limita el crecimiento y la productividad de las plantas de cultivo. Sus efectos se cuantifican en pérdidas económicas y en la calidad y cantidad de alimentos disponibles para la población (Agroasemex, 2006). Los efectos de la sequía no sólo tienen alcance en la producción de alimentos para consumo humano, sino también en áreas que utilizan plantas o sus productos para producir bienes y servicios, como la ganadería, la medicina tradicional, los biocombustibles, la industria textil y la industria de materiales de construcción (Kumar y Yalew, 2012).

La agricultura en México depende principalmente del agua de temporal. Debido al calentamiento global, el ciclo de lluvias se ha alterado y ocasiona sequías severas por ausencia e irregularidad de lluvias, o inundaciones por exceso de lluvias en sitios donde normalmente ninguna de estas situaciones ocurría. Un ejemplo de esto es que en el año 2009 se presentó en México la segunda peor sequía de los últimos 60 años, mientras que el año siguiente, el 2010, fue históricamente el más lluvioso (El Economista, 2012). En el año siguiente se presentaron nuevamente sequías de severidad elevada en el centro y norte del territorio mexicano (CONAGUA, 2012). Por todo esto, el panorama para la producción de alimentos en las próximas décadas no es esperanzador y requerirá un esfuerzo multidisciplinario para lograr garantizar el abastecimiento de productos vegetales en un ambiente errático (Folger, 2014). Existen varios ángulos desde los cuales se puede abordar la búsqueda de soluciones a esta problemática, como el desarrollo de sistemas más eficientes para la administración de los recursos hídricos, hasta la selección y cultivo de variedades vegetales más resistentes a condiciones ambientales de déficit hídrico.

Las monocotiledóneas son un grupo de plantas de gran importancia para la producción de alimentos y una alternativa para la producción de biocombustibles (FAO, 2009). Las monocotiledóneas como el sorgo, el trigo y el maíz constituyen el aporte principal de calorías para la alimentación humana y animal y se encuentran expuestas a los efectos adversos de la sequía en los sitios donde se cultivan (ASERCA, 2013). Una de las estrategias para solucionar la problemática mundial en la producción de plantas monocotiledóneas es la implementación de métodos de mejoramiento que permitan obtener cultivos tolerantes a la sequía. Para esto es necesario profundizar en el conocimiento de las bases biológicas de la tolerancia.



Dado que la tolerancia de plantas de cultivo se cuantifica en términos de su productividad bajo condiciones de sequía, es necesario analizar la influencia que tiene el déficit de agua sobre la regulación del ciclo de vida de las plantas, así como identificar sus efectos sobre la floración y la productividad de semillas y/o frutos. En este aspecto es especialmente importante identificar las bases biológicas que dirigen reajustes en el ciclo biológico de las plantas y que en consecuencia, permiten a las plantas florecer y asegurar la productividad en el tiempo oportuno. Este tipo de estudios se facilita con el empleo de plantas modelo como *B. distachyon*.

En este trabajo se presenta un análisis detallado del ciclo de vida de *B. distachyon* tratado con diferentes niveles de sequía y sus efectos sobre parámetros de crecimiento, la producción de flores y el rendimiento de semillas. Para esto se analizaron 4 variantes naturales que presentan ciclos de vida de distinta duración, con floración temprana y tardía, y con diferentes susceptibilidades a la sequía.

Los resultados de este trabajo contribuyen a ampliar el conocimiento la respuesta a la sequía basada en la plasticidad fenotípica del tiempo a floración y su contribución a la productividad de semillas en condiciones de estrés.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 El ciclo de vida de las plantas

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas atraviesan por fases de desarrollo que se caracterizan por cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos. En las plantas gimnospermas (plantas vasculares que producen semillas, flores y frutos), estas fases incluyen la etapa embrionaria, la germinación, la etapa vegetativa, la transición a planta madura, la fase reproductiva con la formación de flores, frutos y semillas, y la senescencia (Meier, 2001).

La etapa embrionaria inicia con la fertilización sexual de un óvulo y su división celular asimétrica para generar al embrión y endospermo. El embrión se desarrolla por división celular, alargamiento y diferenciación, pasando por fases típicas de desarrollo como el estado globular, escutelar y coleoptilar en monocotiledóneas, y el globular, de corazón, torpedo, y cotiledonal en dicotiledóneas (Goldberg *et al.*, 1994). La etapa embrionaria culmina con la maduración del embrión.

El embrión y el endospermo son parte importante de la semilla. Bajo las condiciones adecuadas, la semilla seca absorbe agua, y una parte del embrión, usualmente la radícula, se extiende para penetrar las estructuras que la rodean. Enseguida emerge el hipocotilo en forma de arco y las primeras hojas. El hipocotilo, por acción de la luz, se endereza y la pequeña plántula, llamada germinado, comienza a adquirir estructura y fuerza para continuar su desarrollo. Este proceso se conoce como germinación (Bewley, 1997).

El periodo de crecimiento posterior a la germinación y previo a la floración se conoce como la etapa vegetativa. En ésta, la plántula comienza a desarrollar hojas, raíces, tallos y ramificaciones. La planta realiza la fotosíntesis para capturar energía y sintetizar compuestos de reserva que serán necesarios para la floración y la reproducción (Meier, 2001).

Una vez que la etapa vegetativa ha avanzado lo suficiente para asegurar su reserva energética, y que las condiciones ambientales son las adecuadas, se inicia la formación de flores, la fertilización y la consecuente producción de frutos y semillas y su maduración. Estos eventos constituyen la etapa reproductiva de la planta. Una vez que la planta ha concluido la etapa reproductiva sobreviene la etapa de senescencia, que se caracteriza por la pérdida de las hojas y en general, la muerte de la

planta, dejando lugar para que las semillas producidas encuentren el momento de germinar cuando las condiciones lo permitan (Bewley, 1997).

Algunas plantas pueden completar su ciclo de vida en el curso de un año o menos, por lo que son llamadas plantas anuales. Otras plantas viven por periodos más largos y año con año pasan por la etapa vegetativa y la reproductiva una y otra vez. Estas plantas son llamadas perennes. Independientemente de que se trate de plantas anuales o perennes, la longitud de sus fases de desarrollo y la transición entre fases están determinadas genéticamente y se regulan de forma temporal y espacial, por la influencia de señales internas y estímulos ambientales (Tan y Swain, 2006).

## 2.2 La floración

La floración es una de las etapas de desarrollo más importantes en el ciclo de vida de las plantas ya que constituye una característica adaptativa básica para el éxito reproductivo y la supervivencia bajo diferentes condiciones ambientales. La floración comienza con la iniciación y el desarrollo de las flores y culmina con la producción de frutos y semillas, por lo que es una etapa fundamental para asegurar la permanencia de las especies en el ambiente natural. En agricultura, esta etapa es además determinante para el rendimiento de semillas en cultivos comerciales, la obtención de frutos de valor económico y la producción de biomasa.

La floración ocurre cuando los meristemas apicales dejan de producir hojas e inician la producción de flores. Este cambio está mediado por una señal conocida como florígeno, cuyo componente mejor caracterizado es la proteína codificada por *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Huang *et al.*, 2005; Liftchitz *et al.*, 2006; Tamaki *et al.*, 2007). Cuando se dan las condiciones para que la planta florezca, FT viaja a través del floema desde las hojas hasta el ápice, donde induce la diferenciación para la formación de flores.

La transición de la etapa vegetativa a la de floración se regula genéticamente y en respuesta a una combinación de estímulos endógenos y ambientales (Fig. 1) (Bernier y Périlleux, 2006). En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado este fenómeno con una amplia gama de

mutantes y variantes naturales con fenotipos de floración alterados (Koornneef *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2014). Así, se han identificado 5 rutas genéticas principales que controlan esta etapa: ruta del fotoperiodo, de la temperatura, autónoma, del ácido giberélico y de la madurez (Fig. 1).

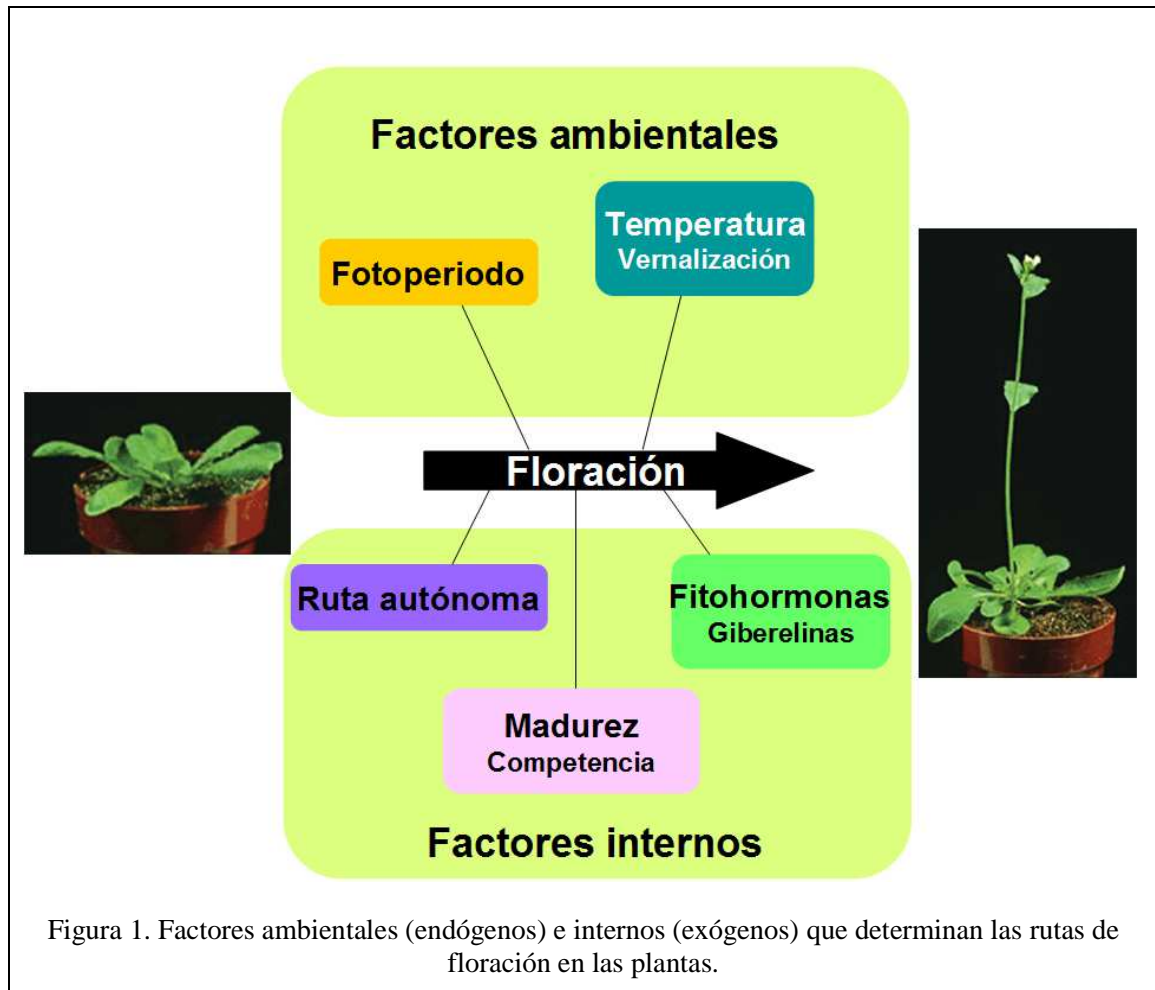


Figura 1. Factores ambientales (endógenos) e internos (exógenos) que determinan las rutas de floración en las plantas.

### 2.2.1 Ruta del fotoperiodo

Los primeros estudios de floración demostraron que las estaciones del año son importantes para inducir la floración de las plantas. De estación a estación, se presentan variaciones en la longitud del día y la noche, es decir, la extensión del tiempo en que se cuenta con luz solar y la extensión del tiempo en que la luz está ausente, en un periodo total de 24 horas. Esto se conoce como fotoperiodo.

Con base en el efecto del fotoperiodo, se puede diferenciar a las plantas que requieren fotoperiodos largos para florecer, como *Arabidopsis thaliana*, de las que requieren fotoperiodos cortos, como el arroz, y de las que son neutrales al fotoperiodo (Tan y Swain, 2006).

Las plantas perciben la luz de diferentes longitudes de onda a través de fotoreceptores especializados, como las fototropinas, los criptocromos y los fitocromos (Mockler *et al.*, 2003). La longitud del día se percibe a través de osciladores internos, tales como genes que se regulan cíclicamente en un periodo de 24 horas (ritmo circadiano), y que por lo tanto responden a cambios ambientales como el ciclo día/noche (McClung, 2006). En la Fig. 2 puede observarse la ruta del fotoperiodo y sus componentes principales.

Con base en estudios del proceso de floración en *Arabidopsis* en respuesta a condiciones de días largos, se ha determinado que la ruta del fotoperiodo tiene tres componentes genéticos centrales. Éstos son *GIGANTEA* (*GI*), *CONSTANS* (*CO*) y *FT*. En condiciones de días largos, la luz induce la interacción de *GI* con proteínas del tipo FKF (FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX). Esta interacción permite la degradación de represores transcripcionales de *CO*, tales como CYCLING DOF FACTOR1 (*CDF1*) (Fornara *et al.*, 2009).

El gen *CO* codifica a un factor de transcripción y al igual que sucede con *GI*, su expresión está regulada por el ciclo circadiano. Una vez que *GI* promueve la expresión de *CO* y su estabilización, *CO* activa a los genes *FT* y *TSF* (*TWIN SISTER OF FT*). La proteína *FT*, reconocida como el florigeno, se mueve de las hojas hacia el meristemo apical donde interactúa con el factor de transcripción FLOWERING LOCUS D (*FD*) para iniciar la transición floral. Una vez que *FT* y *FD* interactúan en el meristemo apical y se forma el complejo *FT-FD*, éste tiene como blanco a SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (*SOC1*), un factor de transcripción del tipo MADS box, sobre el cual ejercen regulación positiva (Amasino y Michaels, 2010).

Además de los factores previamente mencionados, existen otras proteínas que participan en la ruta del fotoperiodo. Ejemplos de éstas son DAY NEUTRAL FLOWERING (*DNF*), CONSTITUTIVELY MORPHOGENIC (*COP1*) y SUPRESSOR OF PHYA-105 (*SPA*), que actúan como represores durante la regulación postraduccional de la proteína *CO* (Morris *et al.*, 2010).

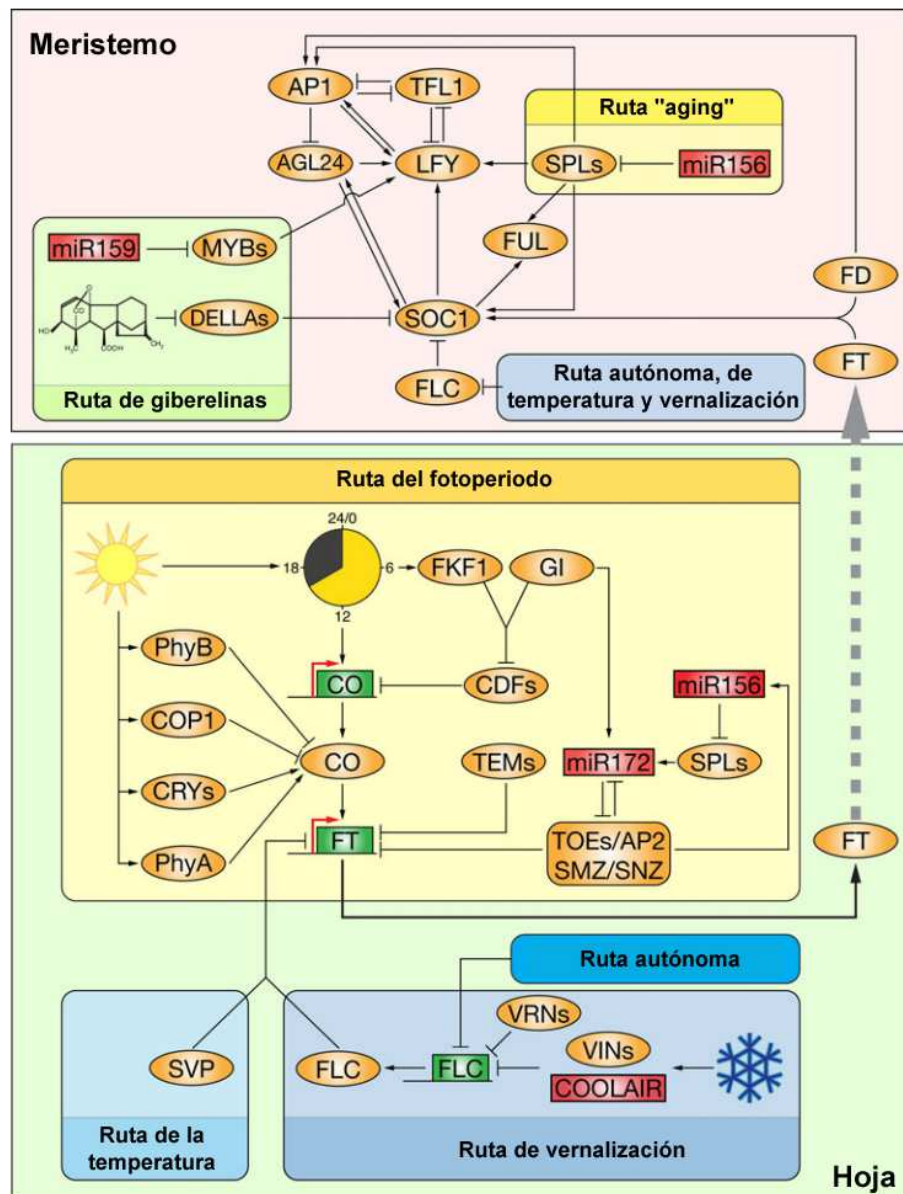


Figura 2. Integración de las rutas de floración. Componentes genéticos principales de las 5 rutas de floración: fotoperiodo, temperatura y vernalización, ruta autónoma, ruta de giberelinas y ruta de "aging". Las señales de las diferentes rutas integran a LFY (LEAFY), FT (FLOWERING LOCUS T) y/o SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1). Los integradores activan directa o indirectamente a AP1 (APETALA 1), el cual marca el comienzo de la formación de órganos florales (Srikanth y Schmid, 2011).

Recientemente, Wahl *et al.* (2013) reportaron que algunos componentes fotosintéticos pueden actuar en las hojas en forma fotoperiódica para alimentar a la ruta del fotoperiodo. En especial, se ha visto que los niveles de trehalosa-6-fosfato (T6P) aumentan al mismo ritmo que se acumula el transcrito de *FT* en días largos. En mutantes de *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE* se observó que *FT* redujo su pico máximo de expresión y la floración se retrasó. Estos resultados indican que existe una relación entre los niveles de T6P y la inducción de *FT* en la ruta del fotoperiodo, aunque también se obtuvieron evidencias de que T6P participa en rutas que no son dependientes del fotoperiodo y que implican la activación de la familia de proteínas SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE 3, 4 y 5 (SPL3, 4, 5) en el meristemo apical, que junto a su regulador, el microRNA156, actúan en la ruta de la madurez o ruta de "aging" (Wahl *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Ruta de la vernalización

Además del fotoperiodo, la temperatura tiene un efecto importante sobre la floración. Por una parte, algunas plantas requieren un periodo de baja temperatura, fenómeno llamado vernalización, equivalente al frío que naturalmente se experimenta durante el invierno, para florecer en la siguiente estación. Generalmente, las plantas que requieren vernalización son de floración tardía, y las que no la requieren son de floración temprana (Ream *et al.*, 2014). Por otra parte, para otras plantas los niveles de temperatura que experimentan a lo largo de sus primeras etapas de vida por sí mismos definen el momento en que se iniciará la floración, sin que esto implique la necesidad de transcurrir por una etapa de vernalización. En la Fig. 2 se muestran los componentes genéticos principales de la ruta de vernalización.

Para el caso de vernalización, de acuerdo a estudios realizados en *Arabidopsis*, esta condición está dada por la función de los genes *FRIGIDA (FI)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *FRI* aumenta la expresión de *FLC* (Werner *et al.*, 2005). *FLC* es un represor floral que actúa bloqueando la expresión de *SOC1* y *FT*. A su vez, *FLC* es reprimido transcripcionalmente por los genes *VERNALIZATION1 (VRN1)* y *VERNALIZATION2 (VRN2)* en un mecanismo de regulación epigenética (He y Amasino, 2002). Adicionalmente, durante el invierno, el frío induce la expresión de *VERNALIZATION INSENSITIVE3 (VIN3)* y de dos RNAs no codificantes llamados *COLD AIR* y *COOLAIR*. Estos tres elementos actúan como represores de *FLC* (Yamaguchi y Abe, 2012).

En el otro caso, donde la temperatura ambiente regula la floración sin que esto implique el paso por un periodo de vernalización, se sabe que uno de los reguladores principales es el gen *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*. SVP es una proteína del tipo MADS-Box que se une a los promotores de *FT* y *SOCI*, actuando como represor floral. Aunque SVP no regula directamente a FLC, se ha demostrado que interactúan y funcionan en forma conjunta (Gregis *et al.*, 2013).

### 2.2.3 Ruta autónoma

La ruta autónoma de floración actúa de forma independiente de la longitud del día. En la ruta participan al menos siete genes: *LUMINIDEPENDENS (LD)*, *FCA*, *FY*, *FPA*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, *FVE*, *FLK* y *REF6*. Todos estos genes actúan reprimiendo la expresión de *FLC*, promoviendo así de manera indirecta la floración (Fig. 2). Algunos de estos genes, por ejemplo, *FLD*, participan en el silenciamiento transcripcional de *FLC* mediante el remodelamiento de la cromatina; otros genes, como *FCA*, ejercen control sobre *FLC* regulando el procesamiento del RNA (Amasino y Michaels, 2010).

### 2.2.4 Ruta del ácido giberélico

Los ácidos giberélicos o giberelinas (GA) son reguladores de crecimiento en plantas y su síntesis es necesaria para la transición floral. El primer paso en la síntesis de GAs está dado por la actividad de la enzima ent-kaureno sintasa, codificada por el gen *GAI*. Por otra parte, las giberelinas bioactivas son reconocidas por las plantas mediante el receptor GIBERELLIC INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) (Shrikanth y Schmid, 2011). Estudios realizados en mutantes *gal* y *gid1* mostraron fenotipos con tiempos de floración alterados, desde el tardío hasta el extremadamente tardío, indicando el requerimiento de la síntesis de GA y de su adecuada percepción para inducir la floración. La inducción de la floración ocurre ya que en presencia de GAs se induce la transcripción de *FT*. Así, tanto GAs como CO actúan en paralelo regulando la expresión de *FT* para inducir la floración. GID1, además de funcionar como receptor, interactúa con proteínas de la familia DELLA, las cuales son reguladoras transcripcionales represoras del desarrollo y crecimiento



vegetal. Cuando *GID1* se une a una proteína *DELLA*, la etiqueta para ser degradada por la vía del proteasoma 26S (Sun, 2011). Algunos componentes importantes de la ruta de las giberelinas se muestran en la Fig. 2.

Dos puntos importantes donde convergen la ruta de las GAs, el fotoperiodo y la temperatura, son los integradores florales *LEAFY (LFY)* y *SOC1*. La aplicación de GA aumenta la transcripción de *LFY*. De igual manera, la aplicación de GA exógeno induce la acumulación del transcrito *SOC1* (Moon *et al.*, 2003). Adicionalmente, el GA aumenta la expresión de otros genes como *AGAMOUS LIKE 24 (AGL24)* en forma dependiente de *SOC1*. A su vez, *SOC1* es regulado por *AGL24*, por lo que forman un bucle de regulación mutua en forma dependiente de GA. Otro gen que es regulado por GAs es *SVP*, el cual actúa como represor de *SOC1*. En este caso, cuando se aplica GA, los niveles de *SVP* decrecen. De esta forma, GA actúa de diversas formas sobre *SOC1*, ya sea promoviendo la expresión de genes que lo inducen, como *AGL24*, o bien, regulando negativamente genes que lo reprimen, como *SVP* (Shrikanth y Schmid, 2011).

### **2.2.5 Ruta de la maduración o "aging"**

La ruta de la maduración o "aging" implica que la planta requiere alcanzar un estatus endógeno de madurez, o un estado de competencia reproductiva, para que sea capaz de florecer. Esta ruta afecta la floración en dos formas; primero, reprime la actividad de represores de la floración, permitiendo a las plantas responder al estímulo de la floración. En segundo lugar, regula directamente a los integradores florales y de identidad de los meristemos.

La ruta de la madurez se caracteriza por la participación de un RNA pequeño no codificante, el microRNA156 (*miR156*) (Yamaguchi y Abe, 2012), cuya acumulación decrece a medida que la planta se va haciendo madura. *MiR156* tiene como genes blanco a transcritos de la familia *SPL*, por lo que al disminuir, sus blancos se acumulan. De esta manera, a medida que la planta adquiere madurez, se acumulan los *SPLs* y promueven la expresión de *LFY* (Yamaguchi *et al.*, 2009) (Fig. 2).

### **2.3 Integración de las rutas de floración**

Las rutas de floración previamente descritas muestran la red compleja de factores genéticos, cuya regulación y función contribuyen a decidir el destino de una planta: florecer o continuar su crecimiento vegetativo. Resumiendo, dentro de esta red genética pueden identificarse al menos 3 elementos integradores sobresalientes: *FT*, *SOC1* y *LFY* (Tan y Swain, 2006; Lee y Lee, 2010). Adicionalmente, se considera como integrador a *FLC*, ya que es un represor dominante de la floración que actúa sobre *FT* y *SOC1* en la ruta de vernalización y en la ruta autónoma. *FT* y *SOC1* también son blancos de la ruta del fotoperiodo. La activación de *FT* es un paso crucial en la inducción de la floración, ya que la proteína FT es el componente principal del florigeno que viaja de las hojas al meristemo para desencadenar el proceso de floración (Shrikanth y Schmid, 2011). Una vez en el meristemo, *LFY* es inducido, y su producto es un factor de transcripción que activa a otros genes para iniciar el proceso de la formación de flores. *LFY* integra las señales de las rutas de GA y de la madurez o "aging" (Wellmer y Riechmann, 2010). En la Fig. 2 se esquematiza la integración de las rutas de floración previamente descritas.

### **2.4 Influencia de otros factores sobre el tiempo a floración**

El fotoperiodo y la temperatura ambiental, aunados a factores endógenos, son los determinantes principales que regulan el tiempo a floración en plantas. Además de estos factores existen otras condiciones que afectan la inducción de la floración, como la calidad de la luz, diversos tipos de estrés como el osmótico y el oxidativo, o la disponibilidad de nutrientes como el fosfato y el nitrato (Cerdán y Chory, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Adicionalmente, el déficit hídrico causado por baja disponibilidad de agua en el suelo debido a la sequía también puede afectar el tiempo a floración, dando como resultado la floración adelantada o la floración tardía.

## 2.5 La sequía y las plantas

La sequía es una causa de estrés en las plantas. En general, el estrés vegetal se define como un factor externo que ejerce influencia negativa sobre una planta. El estrés causado por la sequía inicia cuando se agota el agua disponible en el suelo en la zona de la raíz (Kramer, 1983). Esto produce un estado de deshidratación a nivel celular que desencadena una serie de respuestas. Éstas incluyen cambios en el ciclo celular y en la división celular, cambios en el sistema de endomembranas, en la formación de vacuolas y cambios en la arquitectura de la pared celular (Nilsen y Orcutt, 1996).

El concepto de estrés está íntimamente asociado con la tolerancia, que es la capacidad de la planta para hacer frente a condiciones desfavorables. Si la tolerancia aumenta como resultado de una exposición previa al estrés, se dice que la planta está aclimatada. La aclimatación se distingue de la adaptación porque ésta última se refiere al nivel de resistencia determinado genéticamente, que se ha adquirido por un proceso de selección tras numerosas generaciones (Harb *et al.*, 2010)

La adaptación y la aclimatación a ambientes estresantes son consecuencia del conjunto de respuestas que se producen en los organismos a todos los niveles, desde el anatómico al morfológico, pasando por el celular, el bioquímico y el molecular (Yordanov *et al.*, 2000). A nivel bioquímico, las plantas alteran el metabolismo en varias rutas para adaptarse a los estreses ambientales, incluyendo la producción de compuestos osmorreguladores como prolina y glicina betaina (Yancey *et al.*, 1994). Al nivel molecular, ocurre la percepción inicial de la señal del estrés y la transducción de señales para la inducción y activación de genes de respuesta (Bartels y Sunkar, 2005).

En plantas, la tolerancia al estrés se mide con relación a su supervivencia, a su capacidad de ajustar el crecimiento (acumulación de biomasa) y los procesos de asimilación primaria (incorporación de CO<sub>2</sub> y minerales), y de forma importante en plantas de cultivo, a la capacidad de mantener la productividad de semillas y frutos (Cattivelli *et al.*, 2008).

## **2.6 Mecanismos generales de respuesta a la sequía**

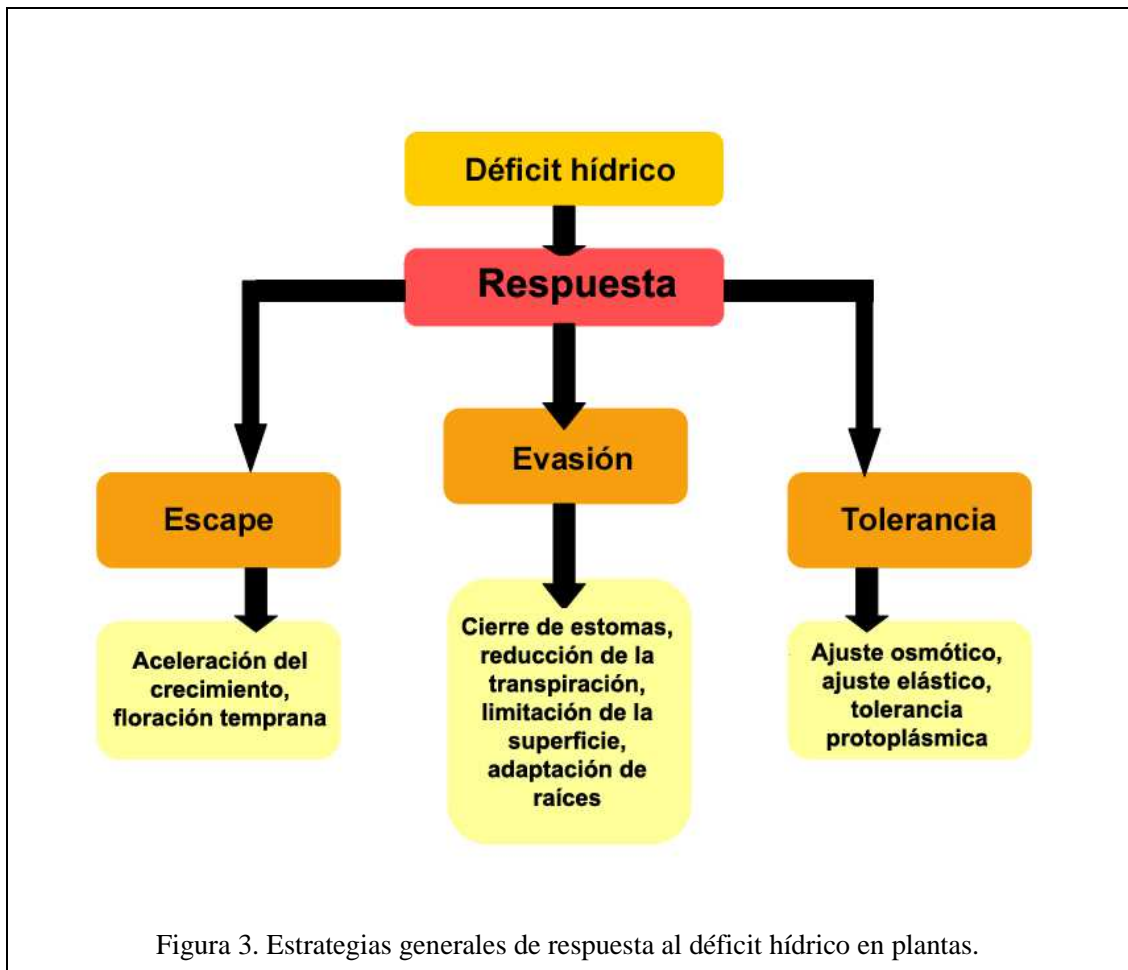
Como consecuencia de las respuestas inducidas por el estrés a diferentes niveles, una planta puede presentar varias estrategias para sobrevivir dentro de los límites de su potencial, a pesar de la disponibilidad limitada de agua. Los mecanismos generales de respuesta a la sequía son el escape, la evasión y la tolerancia (Kramer, 1983). Estos mecanismos no son excluyentes entre sí y dan a cada especie la capacidad de resistir la sequía en un periodo dado durante su ciclo de crecimiento.

El mecanismo de escape está basado en la plasticidad del desarrollo. Las plantas que escapan a la sequía son capaces de acelerar o desacelerar su desarrollo fenológico, adaptando su ciclo vegetativo y reproductivo a la duración e intensidad de la sequía. Como resultado de estos cambios la planta sobrevive o es capaz de generar semillas que aseguran la permanencia de la especie para la continuidad del ciclo productivo. Sin embargo, estos ajustes pueden provocar baja productividad debido a que la floración y la producción de frutos puede ocurrir de forma precoz (Bidinger y Hash, 2004).

Las especies que responden a la sequía con el mecanismo de evasión son aquellas que pueden prevenir o minimizar los efectos del estrés en sus tejidos. Estas especies maximizan la absorción de agua y/o minimizan la pérdida de agua mediante ajustes fisiológicos y morfológicos inmediatos. El aumento de la absorción de agua implica la adaptación de la raíces, consistente en el incremento de la superficie radicular y el crecimiento de raíces secundarias hacia la profundidad del suelo húmedo. Las plantas que son capaces de maximizar la absorción de agua presentan sistemas radicales capaces de penetrar grandes profundidades.

Además de maximizar la absorción de agua, las plantas limitan su pérdida a través del control de la transpiración, principalmente mediante el cierre de los estomas, que son aberturas en la superficie

de las hojas por las que se lleva a cabo el intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera (Taiz y Zeiger, 1998; Sinha, 2004). Además de los estomas, la cutícula, que es una cubierta polimérica extracelular que se deposita en la parte externa de la pared celular, también desempeña un papel importante en el mecanismo de evasión (Cutler *et al.*, 1982). El estrés hídrico ocasiona que la cutícula se deshidrate, lo que provoca cambios estructurales que reducen su permeabilidad al vapor de agua. Finalmente, el plegamiento o enrollamiento de las hojas, un cambio morfológico notable de plantas bajo estrés hídrico, es otra estrategia de respuesta para limitar la superficie de transpiración expuesta al aire y minimizar así la pérdida de agua. Las tres estrategias generales de respuesta al déficit hídrico se muestran en la Fig. 3.



La tolerancia a la sequía se presenta en aquellas plantas que aún sin escapar ni evitar el estrés son capaces de sobrevivir. En la estrategia de tolerancia las células sufren estrés por déficit hídrico pero

responden a través de ajustes que les permiten mantener sus funciones. En la tolerancia existen dos estrategias generales. La primera es el mantenimiento de la turgencia celular mediante el ajuste osmótico y el ajuste elástico. En el ajuste osmótico, las células acumulan solutos compatibles y osmóticamente activos, como la glicina betaína, para mantener la presión hidrostática positiva y forzar el equilibrio hídrico de tal forma que el agua del suelo siga fluyendo al interior de la planta (Yancey *et al.*, 1994). El ajuste elástico es un mecanismo para proteger el potencial de turgencia en células. La elasticidad permite cambios del potencial de turgencia en función de las variaciones de volumen celular. La segunda estrategia es la tolerancia protoplasmática, que mantiene las células vivas a contenidos relativos de agua muy bajos. Suele darse en plantas poiquilohídricas, cuyas estructuras y vías metabólicas pueden recuperarse rápidamente de un estado totalmente deshidratado (Gibson, 1996). En los procesos de escape, evasión y tolerancia, las hormonas vegetales como el ácido abscísico, las giberelinas y las auxinas juegan un papel relevante en la respuesta integral al estrés e inducen cambios en el desarrollo de las plantas (Wang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011).

## **2.7 La sequía y la plasticidad en las plantas**

Al ser organismos sésiles, las plantas están expuestas a condiciones ambientales desfavorables. Esto ha provocado que a lo largo de su evolución hayan desarrollado mecanismos que les permiten tolerar y superar los factores ambientales adversos, como la falta de agua, las temperaturas subóptimas, altas y bajas, la escasez de nutrientes y la depredación, entre otros (Peña-Castro, 2014).

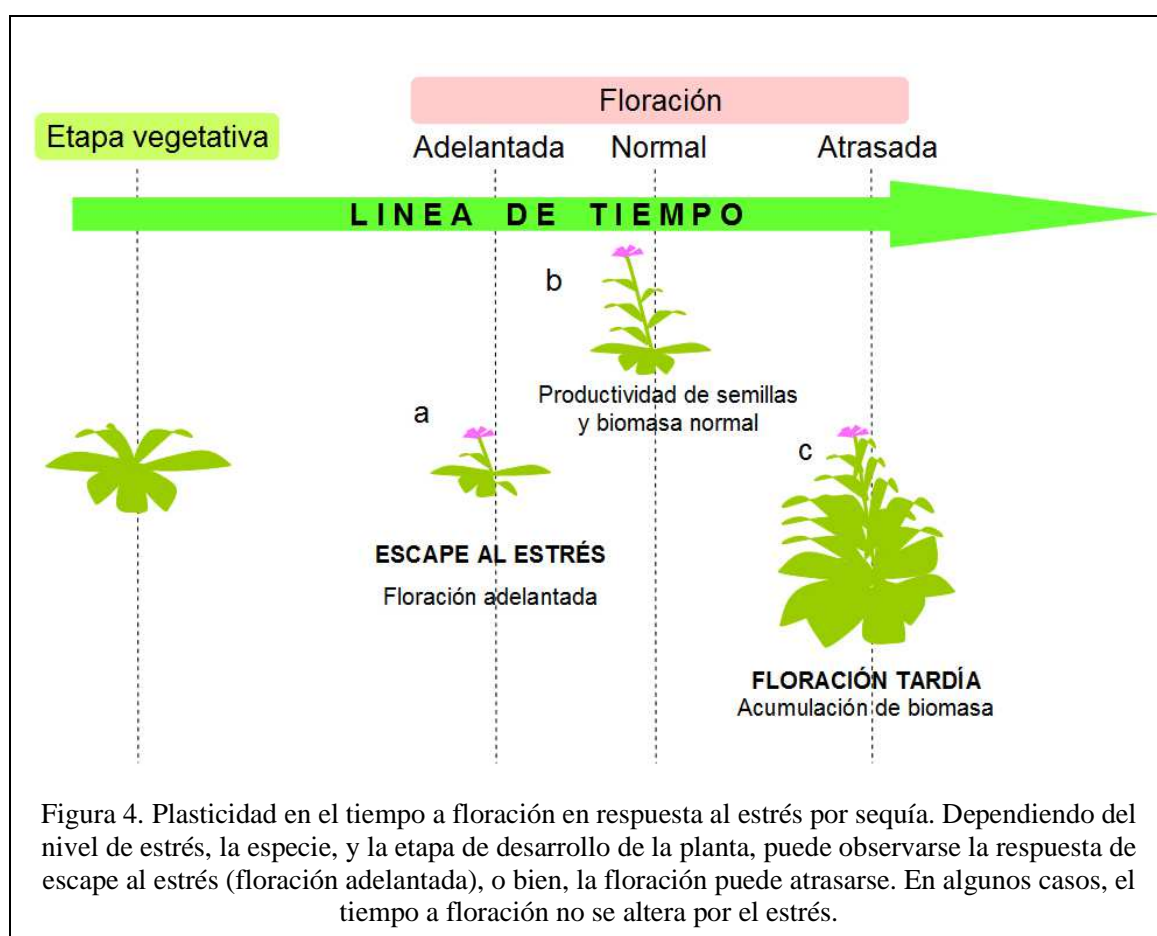
Entre los mecanismos adquiridos se encuentra la plasticidad. La plasticidad es una medida de la cantidad o proporción en que la expresión de las características (el fenotipo), cambia en los organismos debido al efecto de la variación ambiental. La plasticidad es un mecanismo que favorece a las especies ante condiciones heterogéneas, lo que hace que éstas respondan positivamente a la selección natural, definida como la preservación de las variaciones útiles y la eliminación de las nocivas (Matesanz *et al.*, 2010).

La plasticidad implica cambios en caracteres morfológicos, fisiológicos y ecológicos como respuesta a la heterogeneidad ambiental. Un ejemplo que involucra los tres caracteres es el de las plantas de las zonas áridas y semiáridas que pueden cambiar su ruta metabólica de los ácidos

tricarboxílicos a la ruta metabólica C3 (plantas CAM, las que dominan bajo condiciones de estrés hídrico), cuando las condiciones ambientales se tornan lo suficientemente húmedas, o viceversa.

Esto significa que estas plantas pueden, en determinado momento, invadir nuevos hábitats, dándoles ventajas ecológicas y creando con ello la posibilidad de que algunos individuos evolucionen con caracteres diferentes a los de los padres (Winter *et al.*, 2008).

En el estrés por sequía, la plasticidad del tiempo a floración juega un papel importante (Fig. 4). La plasticidad es la base del mecanismo de escape a la sequía y se ha documentado en especies como *Oryza sativa* (arroz), *Avena sativa* (avena), *Brassica rapa* (nabo) y *Mimulus* (flor-mono) (Xu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010; Franks, 2011). Recientemente, en *Arabidopsis thaliana* se estudiaron diversas mutantes de floración bajo condiciones de sequía y se encontró que el gen *GIGANTEA* (*GI*) juega un papel central en la respuesta de escape (Riboni *et al.*, 2013). *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*) también participan en esta respuesta, en la que la sequía induce transcripcionalmente a los florígenos en forma dependiente de ácido abscísico y el fotoperíodo de



días largos. El papel de *GI* es establecer la conexión entre el estímulo fotoperiódico y el estrés ambiental. De acuerdo a los resultados de dicho trabajo, la inducción del fenómeno de escape a la sequía es dependiente de la condición crónica del estrés, así como de la intensidad de la sequía y el estado de crecimiento de la planta durante el estrés (Riboni *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista práctico, el conocimiento de los mecanismos por los cuales las plantas logran adelantar o atrasar la floración en respuesta al estrés podría permitir la manipulación del ciclo de vida de las plantas para inducir la formación de frutos y semillas adelantada y asegurar la producción, o bien, para atrasar la floración favoreciendo la acumulación de biomasa útil para la obtención de biocombustibles. El estudio de plantas que han servido como modelos clásicos en la biología de plantas, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, o bien, de nuevos modelos como la monocotiledónea *B. distachyon*, será de gran utilidad para obtener la información completa de los mecanismos que controlan la plasticidad del desarrollo en respuesta a la sequía.

## **2.8 *Brachypodium distachyon* como modelo de estudio**

En los últimos años, la planta *Arabidopsis thaliana* ha sido el organismo vegetal modelo para una gran diversidad de estudios en biología de plantas. Su tamaño pequeño y genoma simple y totalmente secuenciado, así como la disponibilidad de recursos genéticos gracias a la facilidad para transformarse con *Agrobacterium tumefaciens*, han hecho de *Arabidopsis* el modelo de elección (Meinke *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque la información obtenida de *Arabidopsis* ha sido aplicable para un gran número de plantas, en muchos casos, no es aplicable al grupo de monocotiledóneas, en especial a la familia Poaceae, a la cual pertenecen los cultivos de cereales como el arroz, el maíz y el trigo. Esto puede deberse a que a lo largo de la evolución de las plantas, monocotiledóneas y dicotiledóneas tuvieron eventos de divergencia. Es por esto que surgió la necesidad de contar con plantas modelo monocotiledóneas. El arroz surgió como el primer modelo de este grupo de plantas y su estudio ha permitido comprender aspectos básicos de la biología de las monocotiledóneas (Izawa y Shimamoto, 1996). Sin embargo, el arroz posee un genoma más complejo y un ciclo de vida más largo que *Arabidopsis*, además de tener mayor tamaño.

En el año 2001 se propuso por primera vez a la monocotiledónea *B. distachyon* como modelo vegetal (Draper *et al.*, 2001). En 2010 se publicó la secuenciación del genoma completo de *B.*



*distachyon*, consolidando su potencial como un nuevo modelo para el estudio de las monocotiledóneas (IBI, 2010). En la Fig. 5 se muestran las relaciones filogenéticas de *B. distachyon* con otras monocotiledóneas.

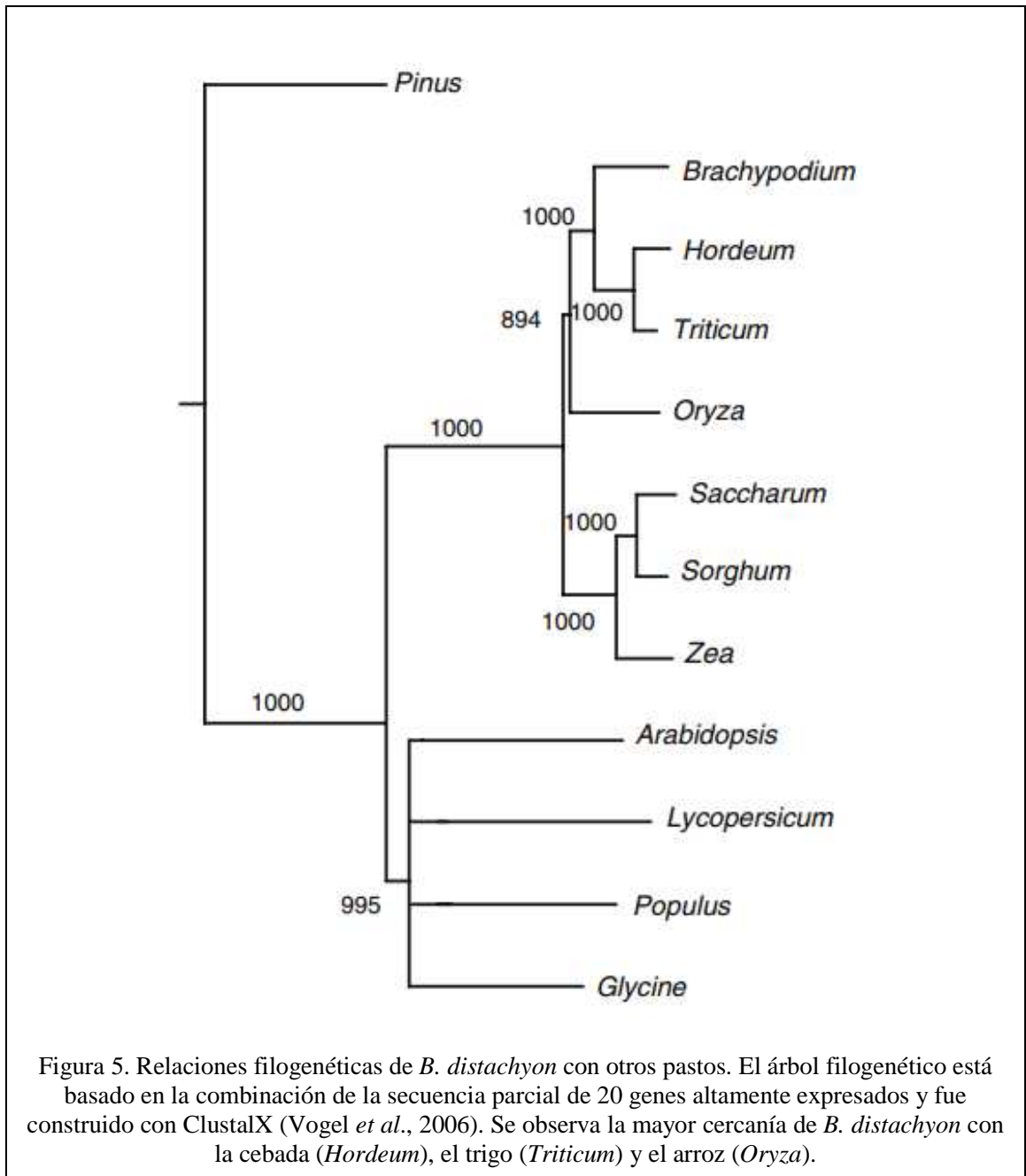


Figura 5. Relaciones filogenéticas de *B. distachyon* con otros pastos. El árbol filogenético está basado en la combinación de la secuencia parcial de 20 genes altamente expresados y fue construido con ClustalX (Vogel *et al.*, 2006). Se observa la mayor cercanía de *B. distachyon* con la cebada (*Hordeum*), el trigo (*Triticum*) y el arroz (*Oryza*).

*B. distachyon* es una hierba silvestre de clima templado. Es similar a *Arabidopsis* en la duración de su ciclo de vida, su estatura y su genoma pequeño de aproximadamente 355 Mpb. Además es autopolinizable, fácil de cultivar, existe en genotipos diploides, tiene requerimientos simples para su crecimiento y se tienen establecidos los protocolos para su transformación con *Agrobacterium* (Vogel *et al.*, 2006; Opanowicz *et al.*, 2008; Vogel y Hill, 2008). El empleo de *B. distachyon* como modelo para explorar la plasticidad del tiempo a floración en respuesta al déficit hídrico requiere la identificación y reconocimiento de sus etapas fenológicas de desarrollo.

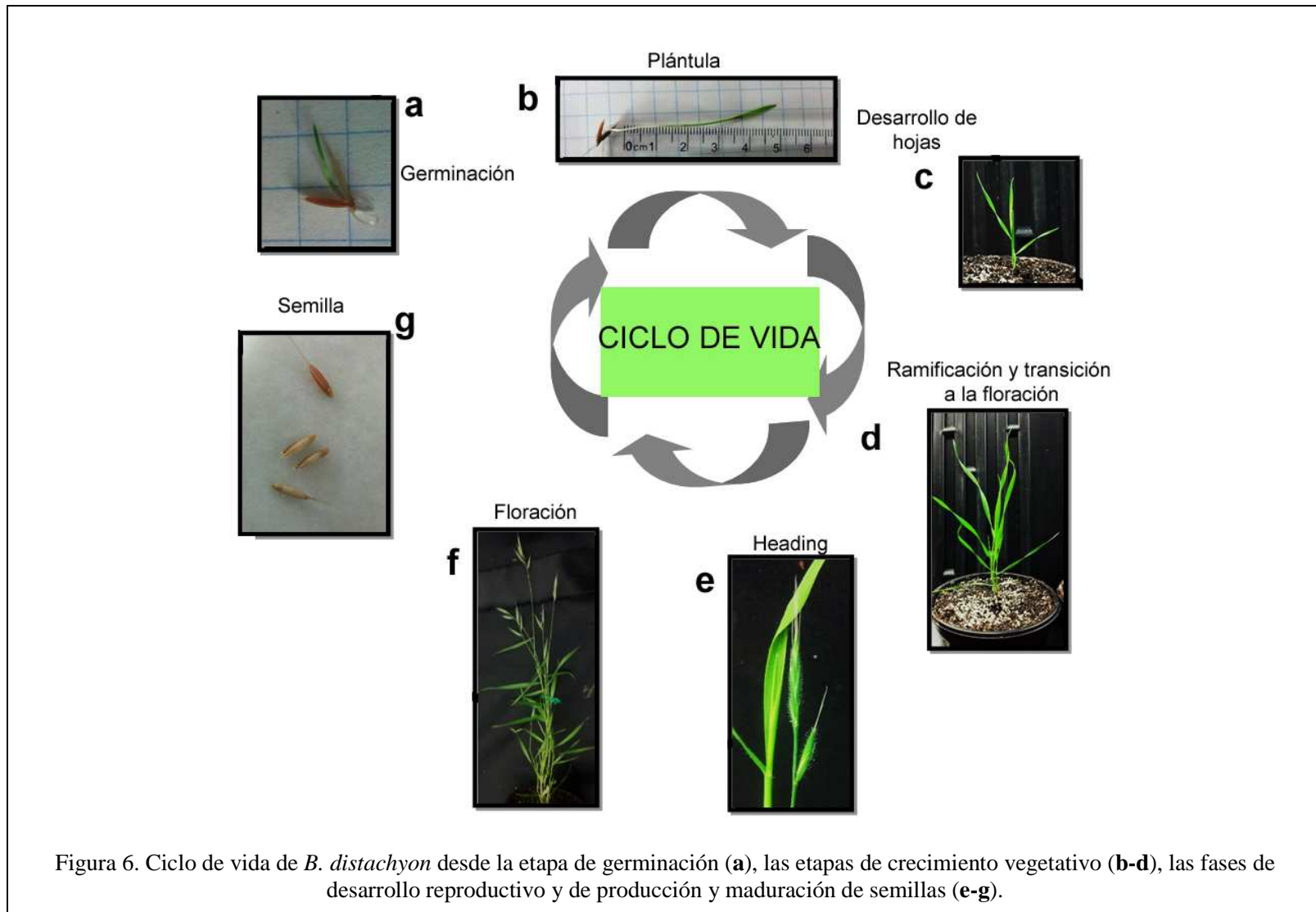
### **2.8.1 Ciclo de vida y etapas fenológicas de *Brachypodium distachyon***

Desde que *B. distachyon* se adoptó como modelo de estudio (IBI, 2010) se han realizado diversos estudios para reconocer los cambios fisiológicos y morfológicos que definen sus etapas de crecimiento. De esta manera, se han identificado por lo menos 10 etapas basadas en la escala BBCH. Esta escala es un sistema de codificación uniforme para la identificación fenológica de estadios de crecimiento aplicable a todas las especies de plantas, el cual constituye una referencia clara del ciclo de vida de las plantas mono- y dicotiledóneas (Hong *et al.*, 2011).

El crecimiento de *B. distachyon* se inicia con la germinación de las semillas. El crecimiento vegetativo consta de tres etapas principales, correspondientes a la germinación de las semillas (Fig. 6a), desarrollo de las plántulas (Fig. 6b), desarrollo de hojas (Fig. 6c) y ramificación (Fig. 6d). La elongación del tallo principal se considera una fase de transición en el que la planta dirige su crecimiento hacia la formación de las primeras flores, más que a la formación de nuevas hojas y su expansión (Fig. 6e). Posteriormente sobreviene la floración (Fig. 6f) y el desarrollo de semillas (Fig. 6g) con la consecuente maduración y senescencia de la planta.

De acuerdo a la escala BBCH, a cada una de las etapas anteriores se le designa un número. La etapa 0 (cero) es la de germinación y tiene una duración de 2 a 5 días a partir de que la semilla es hidratada en el suelo. La etapa 1 inicia una vez que ha emergido la radícula y surge la primera hoja verdadera. La etapa 2 se caracteriza por la formación de ramificaciones. La etapa 3 marca el inicio de una etapa de transición, caracterizada por la elongación del tallo principal. La etapa 4 se manifiesta con el engrosamiento del tallo para iniciar la formación de inflorescencias. Esta etapa es

también conocida como *booting*. La etapa 5 da lugar a un fenómeno conocido como *heading*. En esta fase del desarrollo, el tallo continúa alargándose y la punta de la primera inflorescencia emerge, al grado de hacer visible la primera inflorescencia, aunque la floración propiamente dicha apenas da inicio. La etapa 6 es la floración. Las etapas 7 y 8 transcurren con el desarrollo de las semillas en todas sus fases. La etapa 9 se caracteriza por la maduración de la planta (Hong *et al.*, 2011).



Aunque *B. distachyon* es una especie en la que las fases de desarrollo vegetativo y reproductivo están temporalmente separadas, algunos factores adelantan o retrasan la transición a la floración en esta especie, y en general, en un gran número de plantas (Wada y Takeno, 2010). Condiciones como el fotoperiodo, la temperatura, la intensidad de la luz y la disponibilidad de nutrientes, son importantes en el control del proceso. Adicionalmente, la transición floral comprende varios pasos desde la percepción de las condiciones medioambientales hasta la diferenciación de estructuras tridimensionales, el primordio floral y el meristemo (Zeevaart, 1976). De esta forma, el momento en que se da la transición a la floración se determina por la interacción entre la competencia de la planta, controlada por su programa de desarrollo interno y las señales medioambientales que marcan las condiciones más favorables para su eficiencia reproductiva (Hong *et al.*, 2011).

## **2.9 Variación natural de la respuesta a sequía y del tiempo a floración en *B. distachyon***

*B. distachyon* posee una gran diversidad de variantes naturales que constituyen recursos valiosos para estudiar las bases biológicas de la floración y la respuesta a las condiciones del ambiente. En 2011, Luo *et al.*, realizaron un trabajo con el fin de explorar la variación en respuesta del estrés de *B. distachyon*. Este grupo de trabajo identificó 3 variantes tolerantes, 16 moderadamente tolerantes, 32 sensibles y 6 más sensibles. También en 2010, Schwartz *et al.*, investigaron el comportamiento de la floración en variantes naturales de *B. distachyon* en respuesta al frío y a diferentes fotoperiodos, encontrando una variación sustancial en tiempo de floración entre las variantes de *B. distachyon*, lo cual indica un potencial para el uso de la variación natural para el descubrimiento de genes que funcionan en la regulación de la floración de las gramíneas.

### III. JUSTIFICACIÓN

La sequía es un fenómeno caracterizado por la escasez de agua durante un periodo prolongado. Aunque en las regiones naturalmente secas las sequías son eventos frecuentes, en las últimas décadas se han producido sequías en regiones que naturalmente no eran propensas a sufrirlas. Esto ocurre principalmente a consecuencia del cambio climático global que ha alterado el ciclo, la distribución y la abundancia de las lluvias.

La sequía provoca déficit hídrico y afecta el desarrollo de las plantas, por lo que es una contingencia climática con alto impacto en el campo. La agricultura es, por lo tanto, la actividad económica más vulnerable a la sequía. Se reconoce que en México, la sequía es la condición que ejerce el mayor impacto en la productividad de plantas de cultivo en el campo, ocasionando hasta el 80% de las pérdidas económicas debidas a factores ambientales adversos (Agroasemex, 2006). Los estragos de las sequías de los últimos años se extienden en 3.2 millones de hectáreas de cultivo en nuestro país. El campo mexicano enfrenta así el desplome de la producción de los principales granos básicos con pérdidas de alrededor de 150 mil millones de pesos, con más de un millón de productores y ganaderos al borde del colapso en 26 entidades del país (Acosta, 2012). Ante esta problemática se plantea para la humanidad el reto de mantener y garantizar la productividad de plantas de cultivo bajo condiciones ambientales adversas (Boyer, 1982; Gutiérrez-Bonilla *et al.*, 2006; Saldaña-Zorrilla, 2007). Esto se puede lograr mediante el aprovechamiento de los recursos genéticos naturales y el conocimiento de los mecanismos biológicos que permiten la tolerancia a la sequía y la productividad.

La tolerancia a la sequía en las plantas es un rasgo importante para una agricultura sustentable. Además es una característica cuantitativa que depende de mecanismos de adaptación a nivel genético, bioquímico y fisiológico. Como la tolerancia a la sequía, la floración es también una característica compleja. La floración es determinante en las plantas para garantizar la supervivencia de las especies y el éxito reproductivo, y constituye el paso previo a la producción de frutos y semillas, lo que le confiere un alto valor económico en la producción agrícola. Por lo tanto, tanto la tolerancia a la sequía, como la producción oportuna de flores, frutos y semillas, son procesos clave para la producción de alimentos en condiciones de escasez de agua.

El estrés por sequía induce ajustes en el tiempo a floración, por lo tanto es un factor valioso para explorar la plasticidad natural en el desarrollo de las plantas y su productividad, así como de los mecanismos moleculares que la controlan. Para lograrlo es esencial el estudio de una planta modelo como *B. distachyon*, que posee amplia variación natural en tiempo a floración y en tolerancia a sequía, y una relación cercana a cultivos importantes como el arroz, la caña y el maíz. La información que se obtenga del estudio de *B. distachyon* facilitará la integración del conocimiento de la respuesta a la sequía y el proceso de floración, y de esta manera, en un futuro permitirá explorar estrategias biotecnológicas para la selección y el mejoramiento de la productividad de plantas monocotiledóneas de cultivo en condiciones de sequía.

## **IV. HIPÓTESIS**

El déficit hídrico afecta el tiempo a floración y la productividad de semillas de variantes naturales de *Brachypodium distachyon*.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Analizar la variación fisiológica y molecular del tiempo a floración y la producción de semillas en 4 variantes naturales contrastantes de *Brachypodium distachyon* bajo estrés por déficit hídrico.

### **5.2 Objetivos específicos**

5.2.1 Investigar el perfil temporal de desarrollo de variantes naturales de *B. distachyon* en condiciones óptimas de crecimiento.

5.2.2 Caracterizar la variación natural de la respuesta al déficit hídrico en *B. distachyon* mediante el análisis de parámetros fisiológicos de estrés, tiempo a floración y rendimiento de semillas.

5.2.3 Analizar la dinámica de expresión de genes de floración durante el desarrollo de *B. distachyon* en condiciones de déficit hídrico.



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

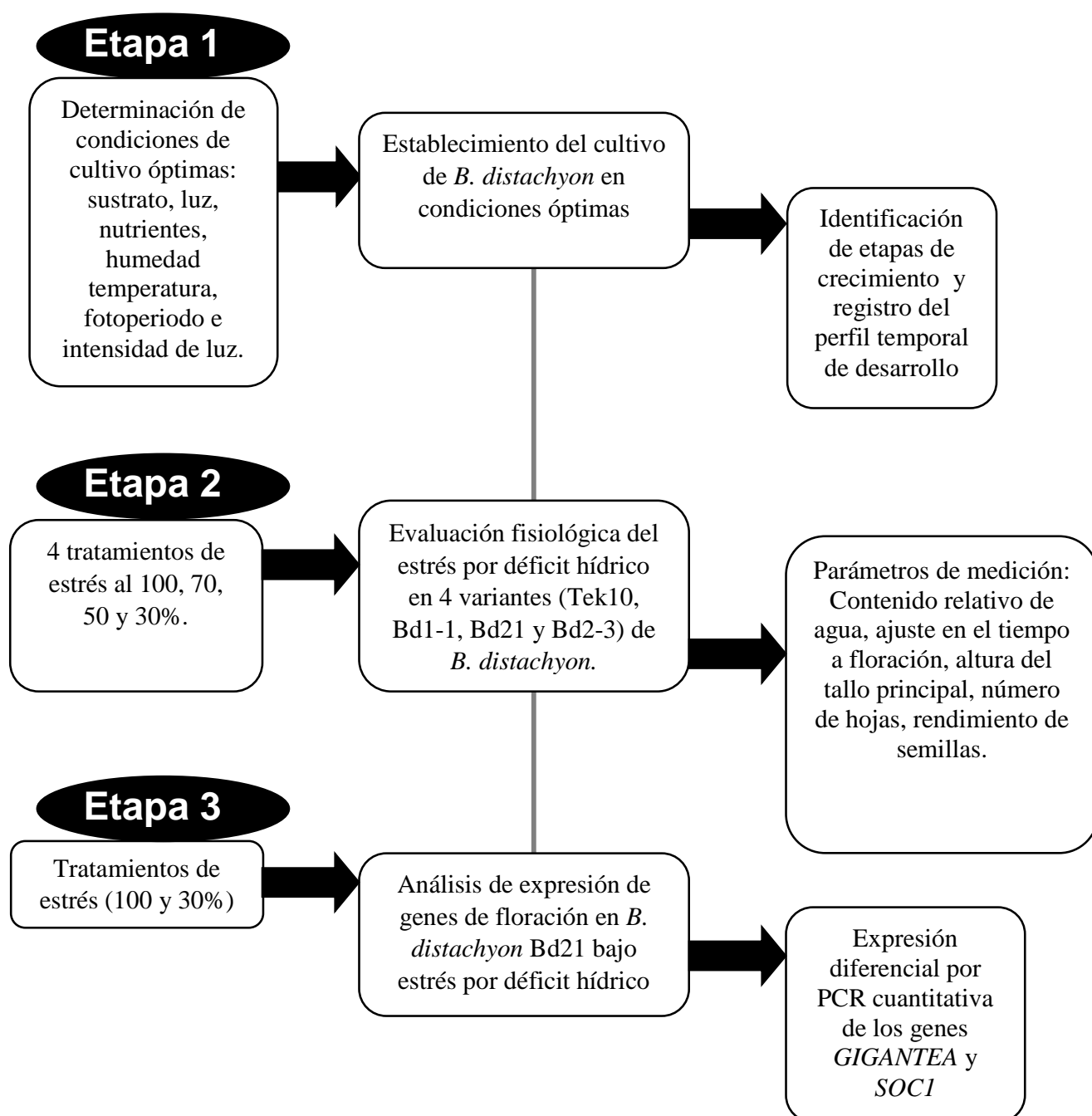


Figura 7. Diagrama general de trabajo. Estrategia experimental en tres etapas.

### 6.1 Líneas de *B. distachyon*

Se utilizó la planta modelo *B. distachyon* y sus variantes detalladas en la Tabla 1. Todas fueron donadas por el Dr. Garvin a través del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-ARS, CA). Se seleccionaron según parámetros de tiempo a floración y tolerancia a sequía reportados previamente (Schwartz *et al.* 2010; Luo *et al.* 2011; Tyler *et al.*, 2014). El establecimiento de los cultivos, así como la evaluación fisiológica, se realizó para las 4 variantes indicadas. La evaluación molecular se llevó a cabo sólo en la variante Bd21.

Tabla 1. Variantes naturales de *B. distachyon* empleadas en este estudio.

Variante	Tolerancia a sequía	Tiempo a floración
Bd21	Sensible <sup>2</sup>	Temprana <sup>1</sup>
Bd2-3	Medianamente sensible <sup>2</sup>	Temprana <sup>3</sup>
Bd1-1	Tolerante <sup>2</sup>	Tardía <sup>1</sup>
Tek10	Tolerante <sup>2</sup>	Tardía

<sup>1</sup> Schwartz *et al.* 2010; <sup>2</sup>Luo *et al.* 2011; <sup>3</sup>Tyler *et al.* 2014.

### 6.2 Germinación y obtención de nuevas semillas de variantes de *B. distachyon*

Para analizar la viabilidad de semillas de las 4 variantes de *B. distachyon*, las semillas se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en una solución de 35ml de hipoclorito de sodio comercial al 1.6% (6% NaClO) con agitación suave en un agitador de doble piso (Cole-Parmer), durante 5 min. Enseguida las semillas se enjuagaron 3 veces, cada vez con 35 ml con agua destilada estéril y agitando manualmente durante 20 s. Los lavados y enjuagues se llevaron a cabo en un tubo estéril y en campana para asegurar un ambiente aséptico. Posteriormente las semillas se incubaron a 4°C durante 4 d sobre papel absorbente humedecido y previamente esterilizado.

Una vez concluida la incubación a 4°C para romper la dormancia, las cajas de petri se transfirieron a un cuarto de crecimiento con temperatura constante de 23°C y fotoperiodo de 20 h de luz y 4 h de oscuridad (condiciones estándar). A los 7 d se registró el porcentaje de germinación y los grminados

se transfirieron a macetas con sustrato y se mantuvieron en condiciones estándar de crecimiento para obtener nuevas semillas.

### 6.3 Etapa 1. Establecimiento del cultivo de *B. distachyon* en condiciones óptimas

#### 6.3.1 Determinación de la intensidad de luz adecuada para el cultivo de *B. distachyon*

De forma preliminar a los ensayos de esta etapa del trabajo, se realizaron pruebas para determinar la mejor intensidad de luz para el cultivo de *B. distachyon* en el cuarto de crecimiento. En este ensayo sólo se incluyeron las variantes Bd21, Bd2-3 y Bd1-1. Tek10 no se incluyó por escasez de semillas. Plántulas de cada una de las variantes Bd21, Bd2-3 y Bd1-1 se cultivaron en 10 macetas de 8 cm de diámetro y 10 cm de profundidad, llenas de sustrato Mezcla Sunshine #3 fina especial (SunGro) que contiene 70-80% turba, vermiculita, piedra caliza, yeso agrícola y agente humectante. El sustrato se esterilizó en autoclave, se suplementó con fertilizante 15N-5P-20K (Nitrofoska Perfect) a razón de 2% del peso total y se hidrató a la máxima capacidad de retención de agua. Las semillas se sembraron directamente en el suelo después de desinfección superficial e incubación a 4°C por 4 días, tal como se indicó en 6.3. En cada maceta se sembraron de 3 a 5 semillas, para después de la germinación dejar únicamente dos plántulas por maceta. Una vez que las plántulas iniciaron su desarrollo, recibieron agua de riego a diario a lo largo de su ciclo de vida completo. Las condiciones ambientales de crecimiento fueron las siguientes: temperatura, 23°C; humedad, 40%; fotoperiodo, 20 horas luz/4 horas oscuridad.

Las variantes de *B. distachyon* se expusieron a tres diferentes tratamientos de intensidad de luz blanca emitida por tubos fluorescentes FLR40D/A (Osram) a lo largo de su ciclo de crecimiento (Tabla 2). Cuando las plantas alcanzaron la edad de 67 días, se registró el número de hojas totales, número de ramificaciones y altura de la planta.

Tabla 2. Tratamientos de intensidad de luz empleados en este trabajo.

Tratamiento	Intensidad de luz
Luz baja	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$
Luz media	100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$
Luz alta	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$

### **6.3.2 Identificación de las etapas de crecimiento de *B. distachyon* y perfil temporal de desarrollo**

Una vez que se determinaron las condiciones más apropiadas para el crecimiento de *B. distachyon*, se establecieron cultivos siguiendo los procedimientos indicados en 6.3.1 con intensidad de luz alta, con el objetivo de obtener el perfil temporal de desarrollo de las variantes Bd21, Bd2-3 y Bd1-1 a lo largo de su ciclo de vida completo. Para esto, las plántulas se monitorearon a diario para identificar el tiempo en que ocurría cada una de las siguientes etapas de desarrollo, de acuerdo a la escala BBCH (Hong *et al.*, 2011):

a) Desarrollo vegetativo. Germinación y aparición de las primeras hojas y ramificaciones. (BBCH: 1 y 2)

b) Transición a la floración. (BBCH: 3, 4 y 5)

-*Booting*. Hinchamiento de la lámina envolvente de la hoja bandera.

-*Heading*. Emergencia y presentación de la punta de la inflorescencia.

c) Floración. La inflorescencia ha emergido completamente. (BBCH: 6, 7 y 8)

Se registró el tiempo en días después de la germinación (DDG) en que se presentó cada una de las etapas de desarrollo en cada una de las variantes.

## **6.4 Etapa 2. Evaluación fisiológica del estrés por déficit hídrico en 4 variantes de *B. distachyon***

### **6.4.1 Diseño de los ensayos y condiciones de crecimiento**

Para realizar la evaluación fisiológica de los efectos del estrés por sequía en 4 variantes naturales de *B. distachyon* se emplearon macetas con las dimensiones señaladas en 6.3.1 y rellenas con sustrato Sunshine. Se prepararon 6 macetas para cada variante, sembrando 2 semillas en cada maceta. Las condiciones ambientales de crecimiento fueron las que se describieron en 6.3.1 con intensidad de luz alta.

### 6.4.2 Tratamientos de estrés

Debido a las diferencias en la extensión del ciclo de desarrollo de cada variante de *B. distachyon*, se realizó un cálculo para dividir el ciclo completo de cada variante en cuatro partes. Durante la primera parte del ciclo correspondiente a cada variante (el primer 1/4), se mantuvieron a las plantas con irrigación adecuada, y a partir de la segunda parte (2/4, 3/4 y 4/4) se dejó de aplicar riego para inducir tres niveles de déficit hídrico (o sequía) que se mantuvieron a lo largo del ciclo completo de vida de cada variante. Los detalles de los tratamientos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos de sequía aplicados a las variantes de *B. distachyon*

Tratamiento	Porcentaje de agua en suelo
Control	100%
Sequía leve (S1)	60%
Sequía moderada (S2)	40%
Sequía severa (S3)	30%

Para ajustar el contenido de agua en el suelo, de forma previa a la siembra, las macetas se llenaron con 120g de sustrato y se colocaron durante 72 h en una estufa a 45°C para su secado. Al término, las macetas se pesaron para registrar el peso seco del sustrato. Enseguida las macetas se irrigaron con agua purificada y se registró el peso húmedo inicial, que sería ajustado en el tratamiento control (100%). Una vez que se sembraron las semillas, a diario se registró el peso del suelo (peso húmedo diario) en todas las macetas. Al transcurrir los días, el contenido de agua se mantuvo al 100% en el conjunto de plantas bajo tratamiento control y de estrés, pero una vez alcanzado el primer 1/4 de vida, las macetas del tratamiento de estrés dejaron de recibir riego hasta que el contenido de agua bajara al nivel correspondiente, de acuerdo a la Tabla 3. A partir de ahí, las macetas se mantuvieron en esos niveles. El porcentaje o contenido relativo de agua en el suelo (RSWC) se calculó de acuerdo a la Ecuación 1.

$$RSWC = \frac{(\text{Peso húmedo diario} - \text{Peso seco})}{(\text{Peso húmedo inicial} - \text{Peso seco})} \times 100 \quad [\text{Ecuación 1}]$$

El peso húmedo se registró diariamente durante el crecimiento de la planta hasta llegar a la etapa de senescencia. Se realizaron adiciones de agua a diario para corregir el contenido de agua y mantenerlo constante durante el experimento. Cuando las plantas habían alcanzado ya un número estable de inflorescencias, se rehidrataron para llevarlas a la conclusión de su ciclo. Una vez que las plantas produjeron inflorescencias secas, se cuantificó el número de semillas obtenidas y su peso. Las macetas bajo condiciones control también recibieron riego regular durante el tratamiento.

#### **6.4.3 Medición de parámetros de crecimiento, balance de agua y producción de semillas**

La evaluación fisiológica de las variantes de *Brachypodium* bajo tratamientos de sequía se realizó mediante la medición de parámetros de crecimiento en varios puntos de su ciclo. Al término de cada uno de los segmentos en que se dividió el ciclo de cada variante se registró el número de hojas, el número de ramificaciones y la altura del tallo principal. Para determinar el balance de agua de las plantas, se calculó el contenido relativo de agua en las hojas, así como el consumo diario de agua, obtenido directamente a partir de la pérdida de peso en cada maceta. Adicionalmente se registró el tiempo a floración, y al término del ciclo de vida se contabilizó el número total de inflorescencias y semillas producidas.

##### **6.4.3.1 Número de hojas, ramificaciones y altura de la planta**

Para observar el efecto de los 3 tratamientos de estrés sobre el crecimiento de las líneas variantes, en cada una de las plantas se contabilizó manualmente el número de hojas y ramificaciones. La altura de la planta se obtuvo midiendo con una regla la altura del tallo principal, desde la base hasta su punto más alto (Fig. 8).

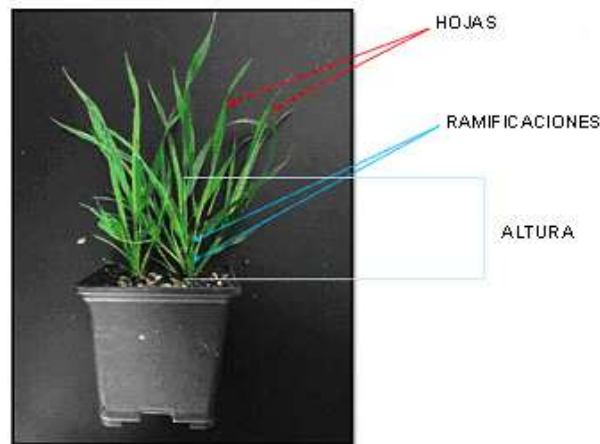


Figura 8. Medición de parámetros fisiológicos de desarrollo en *B. distachyon*.

La reducción en los 3 parámetros de crecimiento debidas a los tratamientos de estrés se calculó al final del ciclo de vida, mediante la Ecuación 2:

$$\% \text{ de reducción} = \left( 1 - \frac{\text{medición estrés}}{\text{medición control}} \right) \times 100$$

[Ecuación 2]

#### 6.4.3.2 Contenido relativo de agua en hojas

Para la caracterización fisiológica del estrés en términos del balance de agua, se realizaron mediciones del contenido relativo de agua en hojas (CRA<sub>h</sub>). Este parámetro permite analizar directamente el grado de estrés que presentan las plantas durante el tratamiento y se calcula con la Ecuación 3 (Barrs y Weatheley, 1968):

$$\text{CRA}_h = \frac{P_f - P_s}{P_t - P_s} \times 100$$

[Ecuación 3]

Donde:

P<sub>f</sub>: Peso fresco de un trozo de hoja.

P<sub>t</sub>: Peso del trozo de hoja a 24 horas de haber sido sumergida en agua desionizada.

P<sub>s</sub>: Peso del trozo de hoja a 48 horas de secado a 68°C.

### **6.4.3.3 Tiempo a floración y número de inflorescencias y semillas**

El tiempo a floración se registró como el día en que cada planta finalizaba la etapa de *heading*, exponiendo de forma visible la primera inflorescencia. Una vez que ocurrió la etapa de floración completa, se registró el número de inflorescencias y de semillas, con la finalidad de cuantificar la producción de cada variante y analizar el efecto de los tratamientos de sequía en parámetros de rendimiento.

## **6.5 Etapa 3. Análisis molecular**

### **6.5.1 Diseño de los ensayos y condiciones de crecimiento**

Para realizar el análisis de expresión de genes de floración en *B. distachyon* se seleccionó la variante Bd21 porque es de ciclo de vida corto. Para los experimentos se emplearon 48 macetas de plástico cuadradas, de 6.6 x 6.6 cm, con 5.5 cm de profundidad, llenas con sustrato Sunshine de acuerdo a los procedimientos indicados en 6.3.1. En cada maceta se establecieron 4 plantas, cuyo ciclo de vida se llevó a cabo en una cámara de crecimiento (Adaptis A1000, Conviron) a intensidad de luz alta, 23°C de temperatura y dos fotoperiodos distintos: Días largos (20h luz/4h oscuridad) y días regulares (16h luz/8h oscuridad).

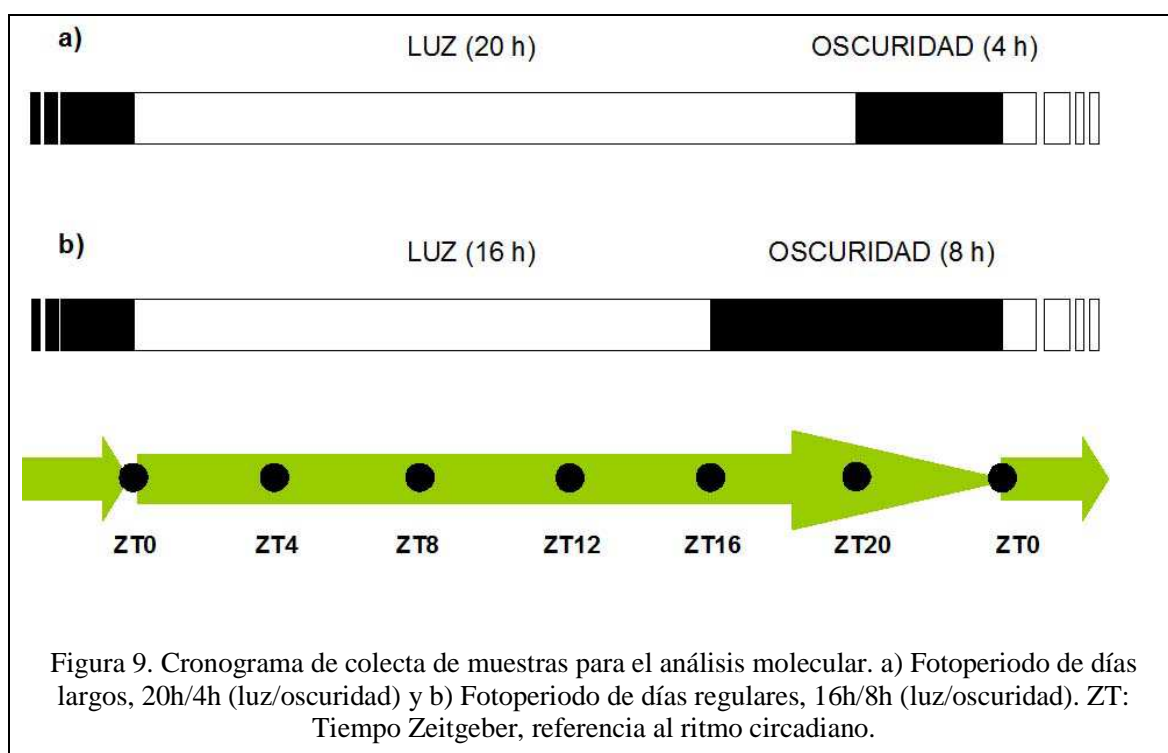
### **6.5.2 Tratamientos y medición de parámetros de crecimiento y de estrés.**

Los tratamientos de estrés se llevaron a cabo como se indicó en 6.4.2, incluyendo los tres niveles de estrés: leve, moderado, severo, y control. De igual manera, para cada experimento se midieron parámetros de crecimiento: número de hojas, número de ramificaciones y altura la planta. Adicionalmente, se calculó el contenido relativo de agua en hojas de acuerdo a la ecuación 3. Finalmente, se reservaron varias plantas para continuar el monitoreo del crecimiento y registrar el tiempo a floración. El ajuste del contenido de agua en suelo se realizó a diario. Las mediciones de parámetros de crecimiento y del contenido relativo de agua en hojas se realizaron el día de la colecta para analizar el estado fisiológico de las plantas.



### 6.5.3 Recolección de tejidos para el análisis molecular

Los experimentos con la variante Bd21 para el análisis molecular se diseñaron para realizar colectas cada 4 horas en un día completo de cultivo, en la proximidad anterior al inicio de la floración. Al momento de la colecta las plantas de ambos fotoperiodos tenían 20 días de estrés, pero en el caso de las plantas en días largos, la colecta se realizó a los 25 DDG, mientras que las de días regulares se colectaron a los 33 DDG debido a diferencias en la proximidad de la etapa de floración. En la Fig. 9 se muestran los cronogramas de colecta que se emplearon para los fotoperiodos aplicados.



En este experimento se colectó la parte aérea de las plantas, que incluyó hojas y tallos, dejando aparte la raíz. Las muestras se colocaron rápidamente en paquetes de papel aluminio y se congelaron en nitrógeno líquido, para almacenar inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador (Thermo Scientific) hasta su procesamiento posterior.

#### **6.5.4. Caracterización molecular**

##### **6.5.4.1 Extracción de RNA**

Los materiales vegetales se redujeron a polvo con un mortero y pistilo estériles, con la adición constante de nitrógeno líquido para facilitar la molienda y asegurar la integridad del RNA. La muestra molida se removió del mortero y se colocó en un microtubo de 1.5 mL previamente congelado en nitrógeno líquido. Se vació aproximadamente un volumen de 500  $\mu$ L de material vegetal. El resto del material pulverizado se colocó en tubos grandes. Todo el material se almacenó en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuras extracciones.

Para la extracción del RNA se empleó el reactivo TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, 15596018). El protocolo de extracción detallado se encuentra en el Apéndice B. Brevemente, a un volumen de 500 $\mu$ L de material vegetal pulverizado se agregaron 1000  $\mu$ L de TRIzol (Invitrogen, 15596018 ). La mezcla se homogenizó rápidamente mediante un vortex hasta que desaparecieron cúmulos de polvo visibles. Los homogenizados se dejaron reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se agregó 200  $\mu$ l de cloroformo a cada tubo y se agitaron manualmente durante 20 s. Las mezclas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en una microcentrífuga refrigerada (Thermo Scientific) a 16.2 g (13,000 rpm) durante 15 minutos. A partir de ese momento, el resto del proceso de extracción se llevó a cabo en hielo a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Después de la centrifugación, la fase acuosa (sobrenadante) de cada muestra se removió con una micropipeta y se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo. Al sobrenadante se le agregaron 1000  $\mu$ L de isopropanol, se mezcló manualmente por inversión durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la precipitación del RNA. Una vez transcurrida la incubación, se centrifugó a 16.2 g (13,000 rpm),  $4^{\circ}\text{C}$ , por 20 min. Al término, se verificó la formación de una pastilla en el fondo del tubo y se desechó el sobrenadante por decantación. La pastilla de RNA se enjuagó con 1000  $\mu$ L de etanol al 80%, con agitación en vortex, para después centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Se desechó la solución de lavado y se dejó reposar la pastilla para evaporar los restos de líquido. Finalmente la pastilla se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua tratada con DEPC (Apéndice A). Los RNAs obtenidos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

#### **6.5.4.2 Cuantificación y análisis de la pureza e integridad del RNA**

La integridad de los RNAs extraídos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante (Apéndice A). Para esto, en microtubos de 1.5 mL se colocaron 2 $\mu$ L de cada muestra extraída, adicionando 2 $\mu$ L de agua tratada con DEPC y 1 $\mu$ L de amortiguador de carga 5X para RNA (Apéndice A). Enseguida, los tubos se incubaron a 65°C en un bloque térmico (Axygen, MC-175-C) durante 5 minutos. Al término, los tubos se transfirieron inmediatamente al hielo por 2 min, se centrifugaron brevemente para coleccionar el líquido de condensación en las paredes del tubo. Las muestras se cargaron en carriles del gel de agarosa desnaturalizante y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal a 80 V, empleando un amortiguador MOPS 1X como solución de corrimiento (Apéndice A). La electroforesis se detuvo al momento en el que el colorante azul contenido en el amortiguador de carga había alcanzado  $\frac{3}{4}$  partes de la longitud del gel. La imagen del gel se adquirió en un fotodocumentador (Ingenius LHR Syngene) mediante el software GeneSnap de Syngene.

La calidad del RNA se verificó mediante el análisis de la intensidad de las bandas ribosomales mayores, así como la ausencia de signos visibles de degradación o de barridos en el gel. La concentración y pureza del RNA total se registró empleando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000/2000e), usando el software del fabricante (Thermo Scientific). Se verificó que las muestras analizadas mostraran relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 entre 1.7 y 2.2.

#### **6.5.4.3 Tratamiento con DNasa**

Para eliminar cualquier resto de DNA en las muestras de RNA total extraídas, se realizó un tratamiento con DNAasa I libre de RNAasa (Thermo Sc, K0252). Para esto, en un microtubo de 1.5mL se colocaron 4 $\mu$ g de RNA total, 4  $\mu$ L de Buffer DNase + MgCl<sub>2</sub>, 4  $\mu$ L de la enzima DNAasa y se agregó agua tratada con DEPC hasta completar un volumen de reacción de 40  $\mu$ L. Enseguida, la reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. Al término, se purificaron las muestras con TRIzol (Invitrogen, 15596018) para eliminar a la DNAasa y componentes del buffer de reacción. Esto se llevó a cabo agregando a la reacción 250  $\mu$ L de TRIzol y continuando el protocolo descrito en 6.5.4.1, pero escalando los volúmenes al 25%. Con las muestras purificadas se realizó nuevamente un gel desnaturalizante de agarosa al 1% para determinar su concentración y pureza. La ausencia de DNA en las muestras se verificó mediante una reacción de PCR para amplificar el gen

actina (gen constitutivo), empleando directamente los RNAs tratados y purificados como molde de amplificación (tal como se señala más adelante en 6.5.4.5), pero sin realizar síntesis de cDNA previa.

#### **6.5.4.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

Una vez que se confirmó la ausencia de DNA, las muestras de RNA se emplearon para sintetizar DNA complementario, con el uso del kit Maxima First Strand cDNA (Thermo Scientific, K1671). En un microtubo de PCR se agregaron los componentes indicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación de reacciones de síntesis de DNA complementario

Componente	Cantidad
Mezcla de reacción 5X	4 $\mu$ L
Mezcla enzimática Maxima	2 $\mu$ L
RNA	1.6 $\mu$ g
Agua tratada con DEPC	Hasta completar 20 $\mu$ L

Una vez preparadas las reacciones, se incubaron en un termociclador (Techne, TC-512) de acuerdo al programa especificado en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de síntesis de DNA complementario

Temperatura	Tiempo
25°C	10 min
50°C	30 min
85°C	5 min

Al término del programa, las muestras de cDNA se diluyeron con agua a razón 1:5 y se almacenaron a - 20° C hasta su uso posterior en reacciones de qPCR.

#### 6.5.4.5 Análisis de la expresión de genes de floración mediante qPCR

Se seleccionaron a los genes *GIGANTEA* (*BdGI*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS* (*BdSOC1*) por estar implicados en la floración para investigar su expresión en *B. distachyon* bajo estrés por sequía. Los oligonucleótidos para amplificar del gen *SOC1* se diseñaron usando el software Primers Express (Apéndice C). Para amplificar el gen *GI*, los oligonucleótidos se tomaron de Lv *et al.* (2014). Los ensayos de expresión de los dos genes se realizaron en todos los puntos de colecta de la cinética (Fig. 9) para el tratamiento control como para el de estrés severo, S3, en los dos fotoperiodos. Como control para la normalización de la expresión, se amplificó el gen *ACTINA 1*, cuya secuencia de oligonucleótidos se obtuvo de Lv *et al.* (2014). Los oligonucleótidos empleados se enlistan en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Gen	Identificación	Oligonucleótidos (5'-----3')	Amplicón (pb)
<i>BdGI</i>	Bradi2g05226	Directo: TACGGATGGGATGCTTGTTG Reverso: CGGCACTTCAGCAGATTTCG	150
<i>BdSOC1</i>	Bradi1g77020	Directo: AGCCTTCGTAGCATCAGGAGAAT Reverso: CTGAAGATCTTCGTTTTTCGCTGCC	145
<i>BdACTIN1</i>	Bradi4g1850	Directo: CCTGAAGTCCTTTTCCAGC Reverso: AGGGCAGTGATCTCCTTGC	188

Para cuantificar los niveles de transcritos de los genes de interés mediante qPCR, se utilizó el kit Maxima SYBRGreen qPCR Reaction Mix (Thermo Scientific, K0252). Las reacciones de qPCR se prepararon en un volumen final de 20  $\mu$ L, empleando los componentes especificados en la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de reacciones de qPCR con SYBRGreen.

Componente	Cantidad
SYBR®Green q-PCR	10 µL
Oligonucleótido directo (10 µM)	0.5 µL
Oligonucleótido reverso (10 µM )	0.5 µL
cDNA (diluido 1:5)	2 µL
Agua tratada con DEPC	7 µL

Estas reacciones se prepararon por triplicado, incluyendo tres reacciones sin cDNA molde como control negativo para cada par de oligonucleótidos. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador de qPCR (PikoReal 96 Real-Time PCR system, Thermo Scientific), de acuerdo al programa detallado en la Tabla 8.

Tabla 8. Programa de ciclado para qPCR con SYBRGreen

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 s	
Alineamiento	60 °C	30 s	40
Extensión	72 °C	30 s	

Los datos de fluorescencia se adquirieron durante la extensión a 72°C. Una vez finalizado el programa, se realizó una curva de disociación para verificar la amplificación de productos únicos en cada reacción. Los resultados se analizaron con el software PikoReal versión 2.2.

Una vez obtenidos los datos de ciclado (Ct) que requirió cada muestra para alcanzar el nivel de fluorescencia umbral, se procedió a realizar el análisis de expresión relativa (ER) de cada gen en los

tratamientos de estrés con respecto al tratamiento control, de acuerdo al análisis de Ct comparativo expresado en la ecuación de Livak y Schmittgen (2001) (Ecuación 4).

$$ER = 2^{-(\Delta\Delta Ct)} \quad \text{[Ecuación 4]}$$

Donde:

$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia})_{\text{Estrés}} - (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia})_{\text{Control}}$

## **6.6 Análisis estadístico**

Los datos fisiológicos se analizaron con el software SigmaPlot 12 ( Windows Platform). Los datos se procesaron para obtener las medidas de tendencia central (media y desviación estándar). Las diferencias observadas entre los tratamientos se investigaron por medio de un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Posteriormente se realizó una prueba de comparación múltiple, bajo la prueba de Dunnett, entre el tratamiento control y los tratamientos de sequía, considerando una diferencia estadística de  $P < 0.05$ . Esto se aplicó al análisis de la distribución del tiempo a floración de las variantes, en el experimento detallado en la sección 6.4.3.3.

Para el análisis de resultados de parámetros fisiológicos en los experimentos de las secciones 6.3.1, 6.4.3.1, 6.4.3.2 y 6.4.3.3, se aplicó la prueba de Tukey entre el tratamiento control y los tratamientos de sequía, considerando una diferencia estadística de  $P < 0.05$ .

El análisis de los resultados de expresión de *GI* y *SOCI* (sección 6.5.4.5) se realizó mediante la prueba *t* de Student, entre el tratamiento control y los tratamientos de sequía, con una diferencia estadística de  $P < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Etapa 1. Determinación de condiciones óptimas de crecimiento

#### 7.1.1 Efecto de la intensidad de luz blanca sobre el crecimiento de *B. distachyon*

Con la finalidad de establecer las condiciones adecuadas para el crecimiento de *B. distachyon* se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar los materiales y parámetros de crecimiento que se han empleado en trabajos reportados previamente. De esta manera se eligió el tipo de sustrato, fertilizante, fotoperiodo, temperatura, y humedad más adecuada para el cultivo. Sin embargo, en lo que respecta a la intensidad de la luz no se encontró un consenso, sino una variedad de intensidades empleadas. Por tal razón, en este trabajo se analizó el efecto de la intensidad de luz blanca sobre las variantes Bd21, Bd2-3 y Bd1-1. Tek10 se omitió en este ensayo por cuestiones de espacio y disponibilidad de semillas. En la Fig. 10 se muestran imágenes de *B. distachyon* bajo las distintas intensidades de luz.

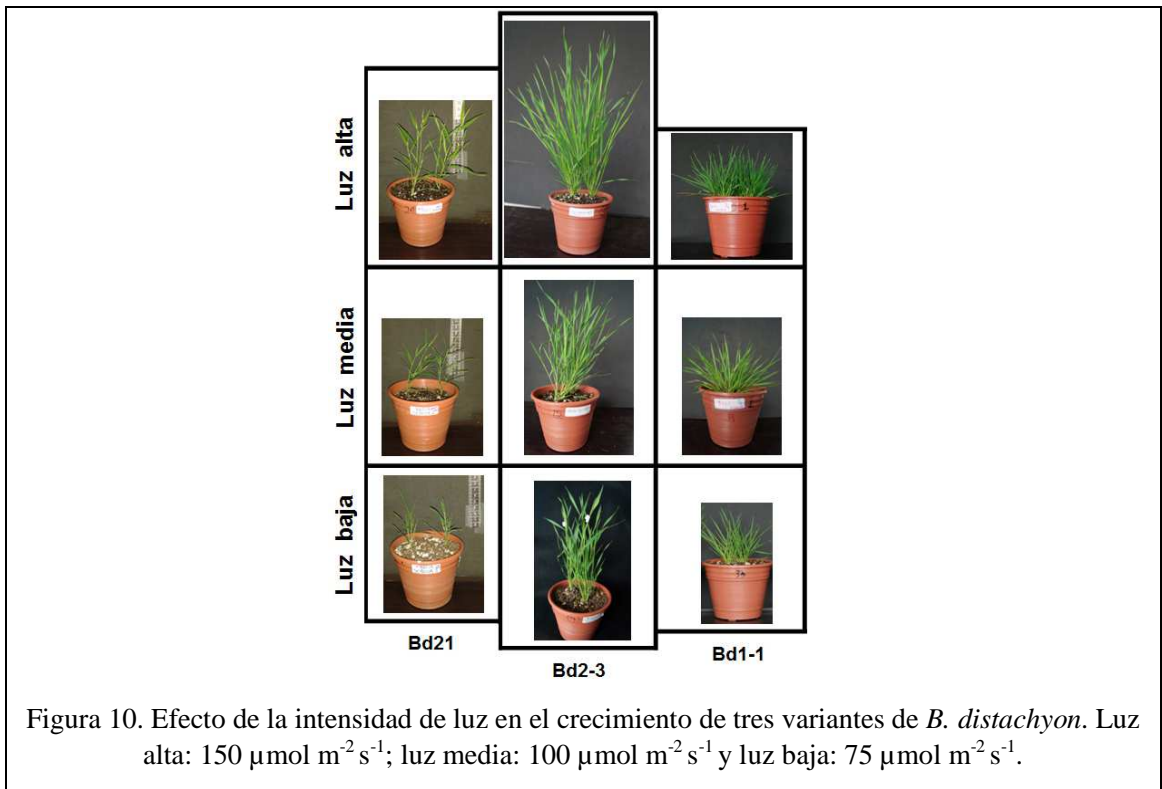
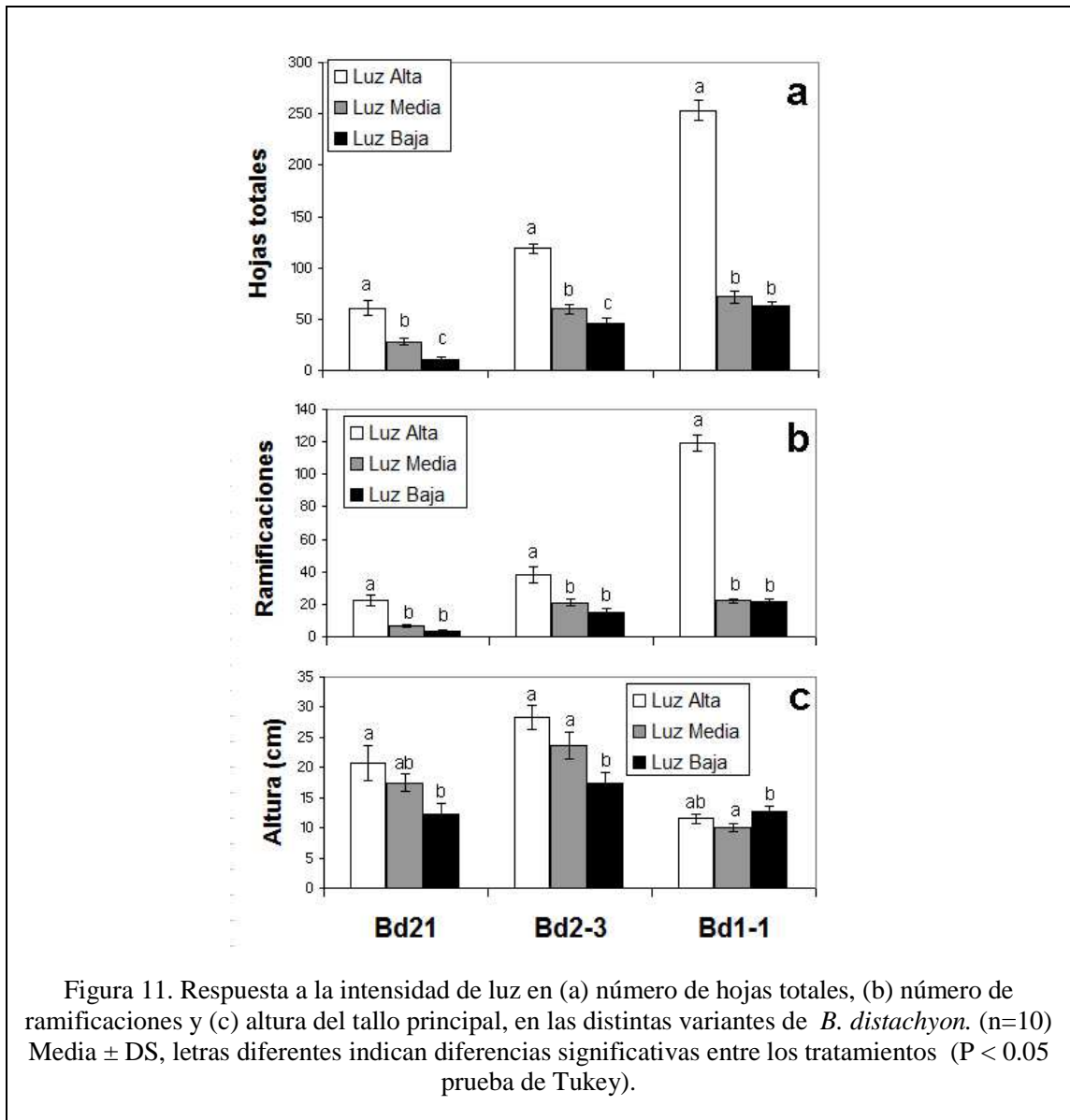


Figura 10. Efecto de la intensidad de luz en el crecimiento de tres variantes de *B. distachyon*. Luz alta:  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; luz media:  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y luz baja:  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



Para estos experimentos se emplearon tres intensidades de luz blanca: Alta ( $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), media ( $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y baja ( $75 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). De acuerdo a los resultados, se observó que la luz alta favorece la formación de hojas en todas las variantes cuando se compara con intensidades media y baja (Fig. 11a). En el tratamiento de luz alta se observaron las mayores diferencias entre las variantes con respecto a la producción de hojas, siendo Bd1-1 la mayor productora, seguida por Bd2-3 y Bd21 (Fig. 11a). Por otra parte, en la variante Bd1-1 los tratamientos de luz media y baja no alteraron significativamente la producción de hojas entre sí, al contrario de lo que ocurrió con Bd1-1 y Bd2-3 para dichas intensidades de luz (Fig. 11a).



Con respecto al número de ramificaciones, se observó que este parámetro está favorecido por la intensidad de luz alta (Fig. 11b). Al comparar entre sí los tratamientos de luz media y baja, se observó que no se inducen diferencias significativas en la formación de ramificaciones, y que en ambos se reduce su número cuando se comparan con los efectos de la luz alta. De forma similar a lo que ocurrió con el número de hojas, la formación de ramificaciones en la variante Bd1-1 fue superior a la de Bd2-3 y Bd21 hasta en un 70% (Fig. 11b). Estas diferencias entre variantes se hicieron evidentes en el tratamiento de luz alta, principalmente.

En lo que respecta a la altura de las plantas, se observaron diferencias entre las variantes. La variante que registró la mayor altura fue Bd2-3, seguida por Bd21 (Fig. 11c). Bd1-1 fue la de menor altura. En Bd2-3 y Bd21 se registró la mayor disminución en altura cuando se aplicó intensidad de luz baja. En contraste, en Bd1-1 la luz media y baja no produjeron cambios significativos en la altura de la planta cuando se compararon con los efectos de la intensidad de luz alta (Fig. 11c). Por todo lo anterior, se eligió la intensidad de luz alta para continuar los ensayos.

### **7.1.2 Perfil temporal de desarrollo de variantes de *B. distachyon***

Una vez determinadas las condiciones óptimas de crecimiento, se analizó el perfil temporal de desarrollo de las variantes Bd21, Bd2-3 y Bd1-1, identificando las etapas morfológicas, tales como el crecimiento vegetativo, la transición a la floración (*booting* y *heading*) y la floración, de acuerdo a la escala BBCH (Hong *et al.*, 2011). Los resultados muestran la variedad de fenotipos de desarrollo de *B. distachyon* en la escala temporal (Fig. 12a-c). Por ejemplo, Bd21 desarrolló tejido vegetativo durante los primeros 24 días después de la germinación (DDG) (Fig. 12a, d). Al 25 DDG se presentaron las etapas de *booting* y *heading*, culminando alrededor del 28 ( $\pm 2$ ) DDG con la emergencia total de sus primeras flores. En Bd2-3, los primeros 61 DDG se observó el crecimiento vegetativo, y a los 64 ( $\pm 5$ ) DDG se presentó la emergencia de flores (Fig. 12b, d). Por otra parte, Bd1-1 presentó el ciclo de vida más largo, con crecimiento vegetativo durante los primeros 125 DDG y la emergencia total de su primera inflorescencia alrededor de 128 ( $\pm 3.2$ ) DDG (Fig. 12c, d). Con estos resultados se confirma la amplia variación natural en la duración de las etapas de desarrollo y el tiempo a floración que existe entre variantes de *B. distachyon*.

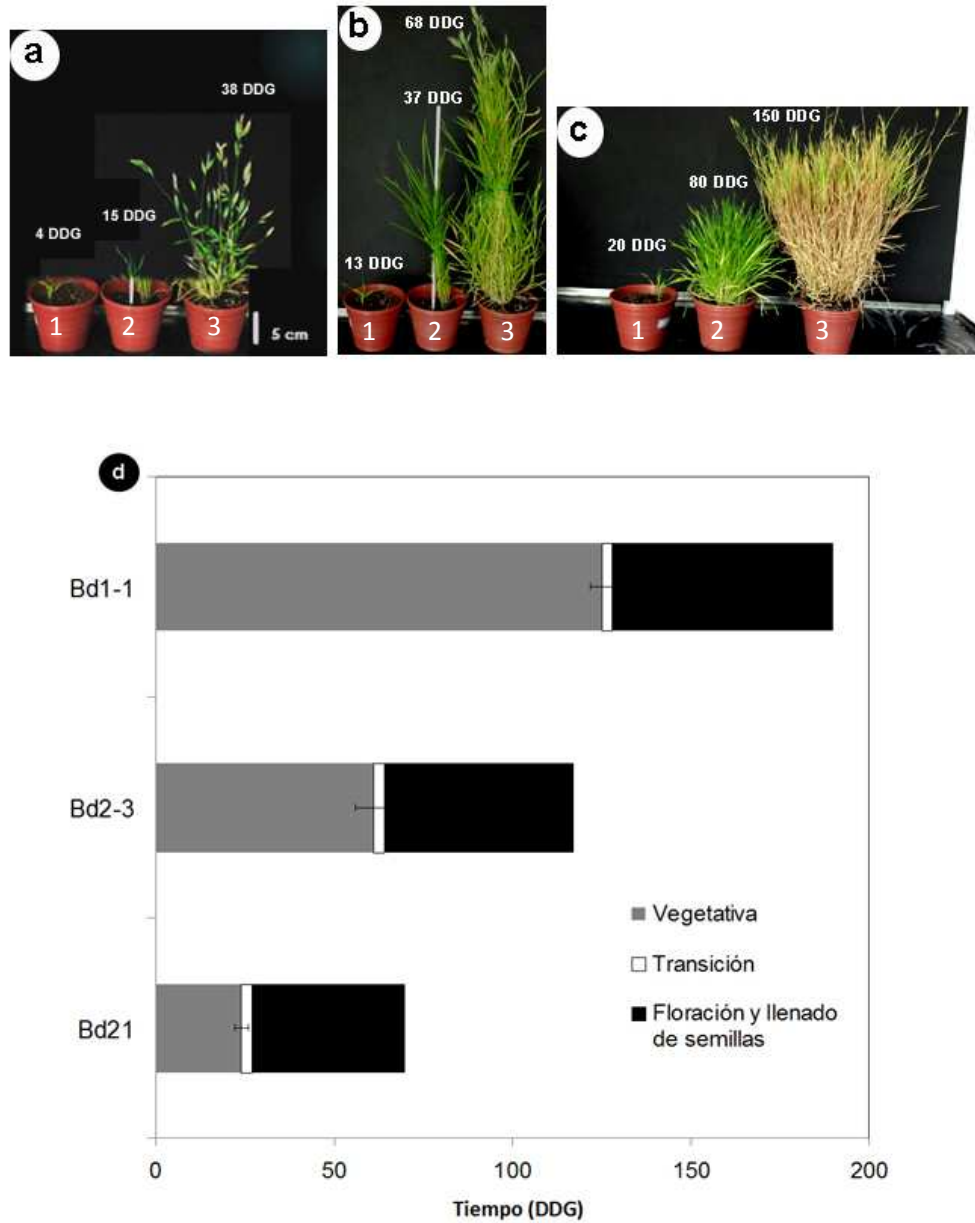
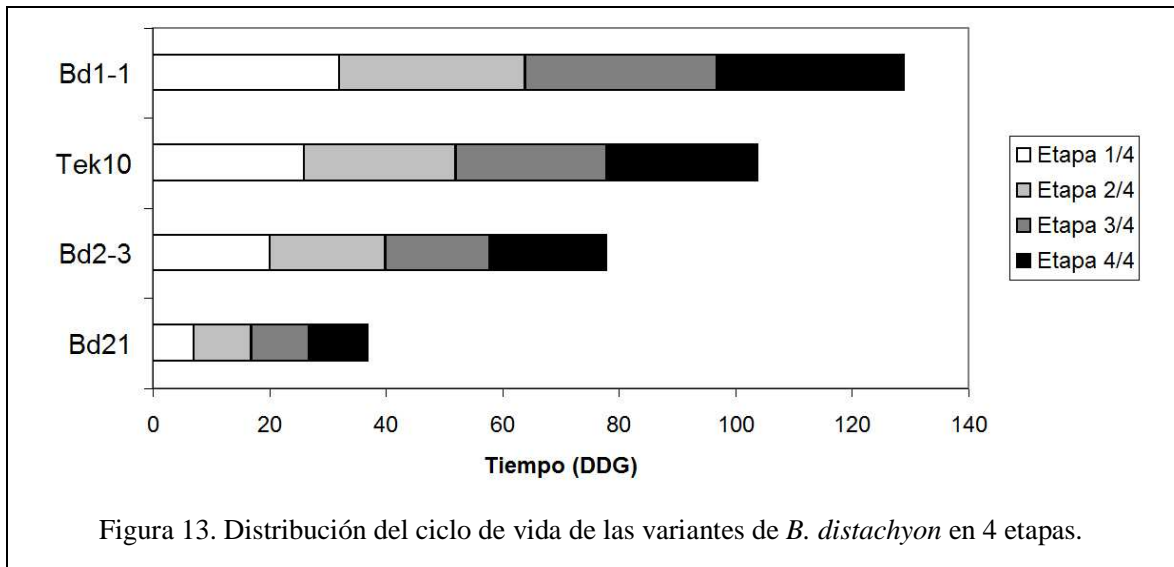


Figura 12. Perfil temporal de crecimiento de *B. distachyon*. (a) Bd21, de izquierda a derecha: 1 Etapa vegetativa, 2. etapa de transición a floración y 3 floración. (b) Bd2-3. Mismo orden que Bd21. (c) Bd1-1, mismo orden. (d) Escala temporal de desarrollo. Las plantas se mantuvieron en fotoperiodo de 20 h luz/ 4 h oscuridad, con una intensidad de luz de 120-150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (n=10) El experimento se siguió hasta llegar a la etapa de senescencia de cada variante.

## 7.2 Etapa 2. Evaluación fisiológica

### 7.2.1 Efectos generales del estrés hídrico sobre variantes de *B. distachyon*

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa 1 se determinó la duración del ciclo de vida completo de las variantes Bd21, Bd2-3 y Bd1-1 en condiciones óptimas de crecimiento. Adicionalmente, en un experimento preliminar se investigó el ciclo de vida de la variante Tek10. Con esta información, el tiempo de vida promedio de cada variante se dividió en 4 periodos iguales y se diseñaron experimentos para observar los efectos del estrés hídrico crónico en tres niveles de intensidad, los cuales se aplicaron a lo largo de los 3 últimos cuartos de vida de cada variante. La extensión de cada uno de los periodos en que se dividió el ciclo de vida de las variantes se muestra en la Fig. 13.



Los tratamientos de sequía en diferentes intensidades produjeron síntomas típicos de estrés hídrico en todas las variantes de *B. distachyon*. Los primeros síntomas visibles fueron el enrollamiento de las hojas y el oscurecimiento del color verde en el tejido aéreo de las plantas. Adicionalmente se observaron efectos de ajuste del desarrollo inducidos por la naturaleza crónica del estrés. A pesar de que las variantes estudiadas presentan ciclos de vida de distinta duración, se observó que en general inducen respuestas similares para sobrevivir al déficit hídrico.

Uno de los efectos más notorios del estrés crónico fue el ajuste en el tamaño de las plantas. Comparando con las plantas mantenidas en condiciones de riego normal (tratamiento control), las plantas bajo los tratamientos de estrés limitaron su crecimiento en forma proporcional a la intensidad del estrés. En la Fig. 14 se muestran imágenes de las 4 variantes tratadas con sequía en tres intensidades, a lo largo de su ciclo de vida completo.

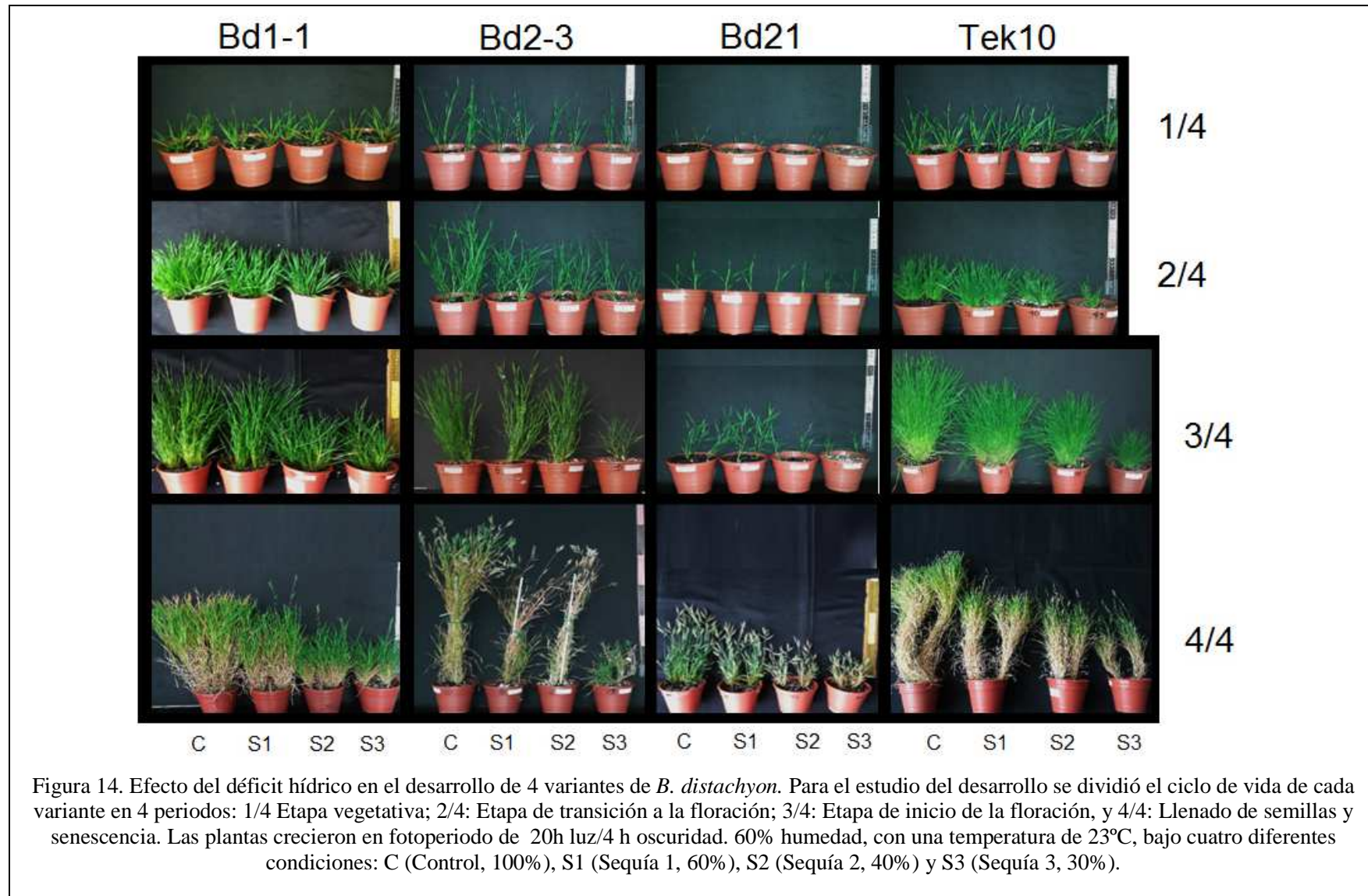
### **7.2.2. Efectos del estrés sobre parámetros de crecimiento**

Para cada una de las variantes se registraron mediciones de parámetros fisiológicos desde la germinación hasta la senescencia en todos los tratamientos aplicados (Fig. 15a-l). Los parámetros fisiológicos analizados fueron el número total de hojas, número total de ramificaciones y altura de la planta.

Es importante señalar que debido a que los tiempos de tratamiento se adecuaron al ciclo de vida de cada variante, la etapa correspondiente al primer 1/4 de vida, en la que se mantuvo a las plantas bajo condiciones normales, fue de mayor duración en aquellas variantes con ciclo de vida largo. Por tal razón, la variante Bd1-1 y Tek10, que son las de ciclo de vida más largo, mostraron  $29 \pm 6$  hojas totales y  $47 \pm 8$  hojas totales, respectivamente, al momento en que terminaron su primer cuarto de vida y dieron inicio los tratamientos de estrés. Para las variantes de ciclo corto, Bd2-3 y Bd21, los tratamientos de estrés se iniciaron cuando contaban con  $9 \pm 1$  y  $2 \pm 1$  hojas totales, respectivamente.

#### **7.2.2.1 Variante Bd21**

La variante Bd21 desarrolló 2 hojas en el primer 1/4 de vida y no mostró ramificaciones al inicio de las mediciones (Fig. 15a-c). Una vez aplicados los tratamientos de estrés, y al término de la etapa 2/4, las plantas habían desarrollado nuevas hojas y ramificaciones y habían incrementado la altura, sin que los tratamientos de estrés causaran diferencias significativas cuando se compararon con el tratamiento control en alguno de estos parámetros, aunque se observó una ligera tendencia a la reducción en el tratamiento S3 (Fig. 15a-c). En la etapa 3/4 de vida, que coincide con la etapa de floración, el tratamiento S3 ocasionó la reducción en los parámetros, afectando principalmente la altura de la planta (Fig. 15b). El número de hojas fue el parámetro menos afectado por el estrés en esta etapa. En la etapa final (4/4), se observaron reducciones significativas de todos los parámetros en todos los tratamientos de estrés, comparados con el tratamiento control (Fig. 15a-c, Tabla 9).



### **7.2.2.2 Variante Bd1-1**

La variante Bd1-1 mostró el mayor desarrollo de hojas durante su primer 1/4 de vida (Fig. 15d-f). Durante la etapa 2/4, Bd1-1 comenzó a mostrar cambios fisiológicos visibles en los niveles de sequía 2 y 3, principalmente en lo que se refiere a los efectos cualitativos generales que se describieron en la sección 7.2.1. En la etapa 3/4 de vida, los signos de estrés se intensificaron, mostrando ciertas repercusiones en las plantas control de Bd1-1 y las plantas de Bd1-1 tratadas con sequía 2 y 3 con respecto a los tres parámetros analizados. En esta etapa las plantas de Bd1-1 con los tratamientos en estrés 2 y 3 mostraron un alto número de hojas e iniciaban la floración. En la etapa 4/4 se mantuvo la reducción en los parámetros analizados, en forma dependiente del tratamiento de estrés (Fig. 15d-f, Tabla 9). El mayor incremento en el número de hojas totales ocurrió mientras la planta transcurría entre las etapas 2/4 y 3/4, coincidiendo con el periodo de desarrollo vegetativo previo a la floración (Fig. 15d). De igual forma ocurrió con la estatura de la planta (Fig. 15e). En contraste, el número de ramificaciones primarias se incrementó en la etapa 2/4, y a partir de ahí se mantuvieron relativamente estables hasta el final del ciclo. Sin embargo, el estrés por sequía afectó significativamente los parámetros de altura y número de hojas comparadas con la planta control (Fig. 15f, Tabla 9).

### **7.2.2.3 Variante Bd2-3**

En la variante Bd2-3, una vez iniciados los tratamientos de estrés, y al término de la etapa 2/4, ninguno de los parámetros analizados se redujo en los niveles de sequía S1 y S2, excepto en el nivel S3, donde se redujeron todos (Fig. 15g-i). En la etapa 3/4, cuando la planta se encontraba en floración, los tratamientos de sequía causaron reducción en todos los parámetros. Esta reducción se extendió hacia la etapa final (Tabla 9). Sin embargo, en lo que respecta a la altura de la planta, las diferencias entre tratamientos control y sequía S1 y S2 dejaron de ser significativas, ya que las plantas continuaron su elongación (Fig. 15h).

### **7.2.2.4 Variante Tek10**

De acuerdo a lo observado en este trabajo, Tek10 produjo la mayor cantidad de hojas entre las variantes (Fig. 15j). Durante su primer 1/4 de vida, desarrolló en promedio 47 hojas, y llegó al término de su ciclo de vida acumulando hasta 1,400 hojas en el tratamiento control. Además fue la variante que desarrolló un mayor número de ramificaciones ( $58 \pm 4$ ) y altura superior ( $28 \pm 3$  cm) (Fig. 15k, l). En contraste con su capacidad de desarrollar biomasa, los tratamientos de estrés

causaron una reducción significativa en todos los parámetros de crecimiento, en todas las etapas de desarrollo (Tabla 9).

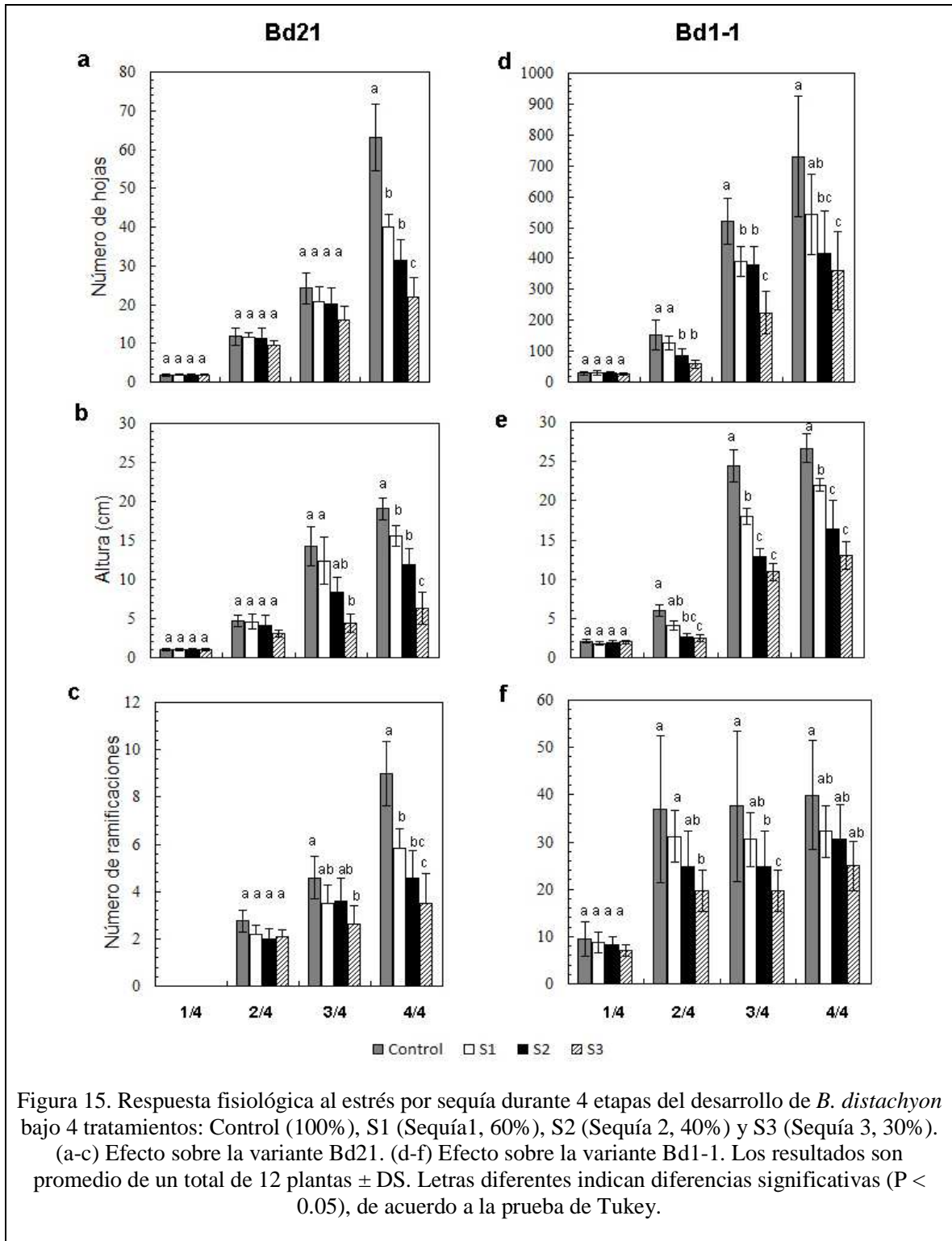


Figura 15. Respuesta fisiológica al estrés por sequía durante 4 etapas del desarrollo de *B. distachyon* bajo 4 tratamientos: Control (100%), S1 (Sequía1, 60%), S2 (Sequía 2, 40%) y S3 (Sequía 3, 30%). (a-c) Efecto sobre la variante Bd21. (d-f) Efecto sobre la variante Bd1-1. Los resultados son promedio de un total de 12 plantas  $\pm$  DS. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), de acuerdo a la prueba de Tukey.



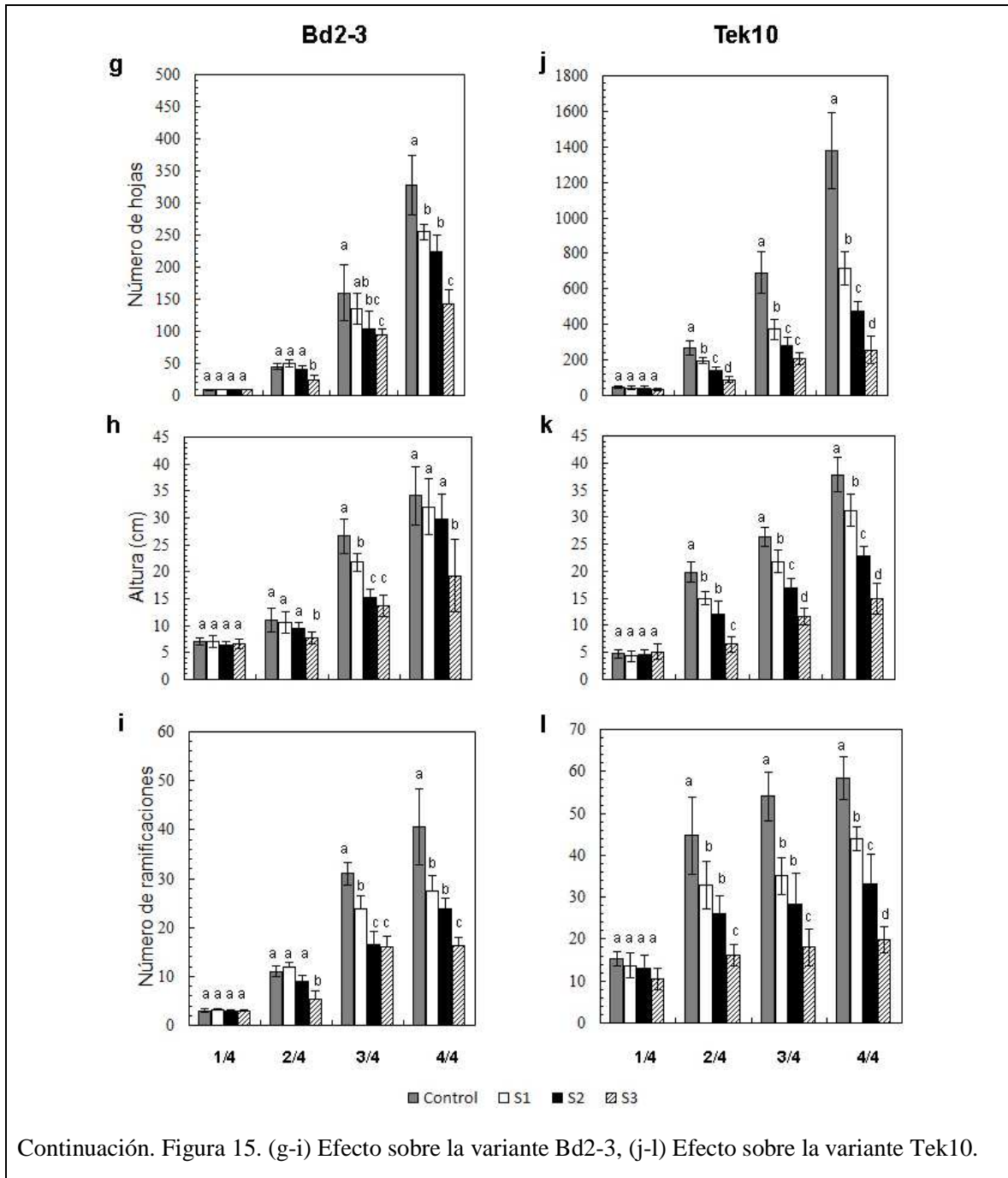


Tabla 9. Porcentaje de reducción en parámetros de crecimiento al final del ciclo de vida relativo al tratamiento control (100%).

Variante	Reducción en número de hojas (%)				Reducción en altura (%)				Reducción en ramificaciones (%)			
	C	S1	S2	S3	C	S1	S2	S3	C	S1	S2	S3
<b>Bd21</b>	0 <sup>a</sup>	36.1 <sup>b</sup> ±4.0	51.8 <sup>c</sup> ±2.0	68.2 <sup>d</sup> ±1.6	0 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup> ±3.3	42.4 <sup>c</sup> ±2.0	72.3 <sup>d</sup> ±2.9	0 <sup>a</sup>	35 <sup>b</sup> ±7.9	49.5 <sup>c</sup> ±7.6	61.9 <sup>d</sup> ±9.3
<b>Bd1-1</b>	0 <sup>a</sup>	24.5 <sup>b</sup> ±6.9	43 <sup>c</sup> ±7.7	55.1 <sup>d</sup> ±4.0	0 <sup>a</sup>	16.7 <sup>b</sup> ±2.9	44 <sup>c</sup> ±3.3	52.4 <sup>d</sup> ±2.8	0 <sup>a</sup>	19.6 <sup>b</sup> ±9.2	21.9 <sup>c</sup> ±6.8	33.3 <sup>d</sup> ±8.4
<b>Bd2-3</b>	0 <sup>a</sup>	21.5 <sup>b</sup> ±6.9	30.8 <sup>c</sup> ±6.2	62.2 <sup>d</sup> ±2.2	0 <sup>a</sup>	7.4 <sup>b</sup> ±1.0	20.6 <sup>c</sup> ±5.0	44.2 <sup>d</sup> ±9.9	0 <sup>a</sup>	31.9 <sup>b</sup> ±5.6	40.1 <sup>c</sup> 8.8	59.2 <sup>d</sup> ±4.1
<b>Tek10</b>	0 <sup>a</sup>	47.8 <sup>b</sup> ±2.7	65.4 <sup>c</sup> ±1.6	81.7 <sup>d</sup> ±2.8	0 <sup>a</sup>	17.4 <sup>b</sup> ±6.5	39.6 <sup>c</sup> ±2.3	60.8 <sup>d</sup> ±4.3	0 <sup>a</sup>	24.5 <sup>b</sup> ±2.7	38.1 <sup>c</sup> ±3.2	66.1 <sup>d</sup> ±2.7

Media ± DS, letras diferentes indican diferencias significativa entre los tratamientos de cada variante (P < 0.05), de acuerdo a la prueba de Tukey.

### 7.2.3. Efectos del estrés sobre el balance de agua

#### 7.2.3.1. Contenido de agua en suelo y consumo de agua

En este trabajo se registró a diario la pérdida de peso en cada maceta como medida aproximada de la masa de agua que cada variante consume a lo largo de su ciclo de vida. Una vez registrado el peso de cada maceta, se agregó agua suficiente para mantener el contenido de agua en los niveles previamente determinados para cada tratamiento (Materiales y Métodos).

La Fig. 16 muestra los resultados del contenido de agua en suelo. En la variante Bd1-1 (Fig. 16a, Tabla 10) se observó que durante el primer 1/4 de vida presentó consumo de agua relativamente alto ( $21.5 \pm 2.6$ ), si se compara con la variante Bd21 ( $7.7 \pm 1.6$ ) en la misma etapa (Fig. 16b, Tabla 10). El mayor consumo de agua se registró durante la etapa de transición y en la floración, llegando a consumir hasta el  $38.1 \pm 1.5\%$  del contenido total de agua en un día en el tratamiento control. El alto consumo de agua de Bd1-1 puede estar relacionado con la gran cantidad de hojas y ramificaciones que desarrolló en todos los tratamientos, lo que aumentó la superficie de evaporación. Además, tratándose de una variante que acumula biomasa, es de esperar que la cantidad de agua requerida para proveer a toda la planta sea mayor. Es interesante que las plantas en tratamientos de sequía disminuyeran su consumo de agua en forma dependiente de la intensidad del tratamiento (Fig 16a, Tabla 10). Esto podría correlacionarse también con el ajuste que realiza Bd1-1 para limitar su biomasa en condiciones de estrés, y de esta forma consumir menor cantidad de agua.

En Bd2-3, el consumo de agua fue elevado en las plantas control durante la etapa de transición ( $46.4 \pm 7.4$ ) y de floración ( $47.1 \pm 11.4$ ) (Fig. 16c, Tabla 10) a niveles comparables, o superiores, con la variante Bd1-1 en la transición ( $38.1 \pm 1.5$ ) y en floración ( $30.4 \pm 7.1$ ). Aunque sus niveles de consumo durante la etapa vegetativa fueron menores que los de Bd1-1, éstos se incrementaron a medida que se avanzó en el ciclo de crecimiento. A pesar de que Bd2-3 desarrolla aparentemente una cantidad de biomasa menor a Bd1-1 sus requerimientos de agua son similares. El consumo de agua en Bd2-3 se limita a medida que se intensifica el tratamiento de estrés (Fig. 16c, Tabla 10); esto podría ser parte de un mecanismo de respuesta dirigido a reducir el gasto de agua en condiciones de estrés crónico.

En Bd21 (Fig. 16b) se registraron los niveles más bajos de consumo de agua a lo largo de sus etapas de crecimiento, con pequeños aumentos durante la etapa de floración ( $10.1 \pm 0.9$ ), pero aún menores

comparados con los del resto de las variantes. El bajo nivel de gasto de agua en Bd21 puede relacionarse con su tamaño compacto.

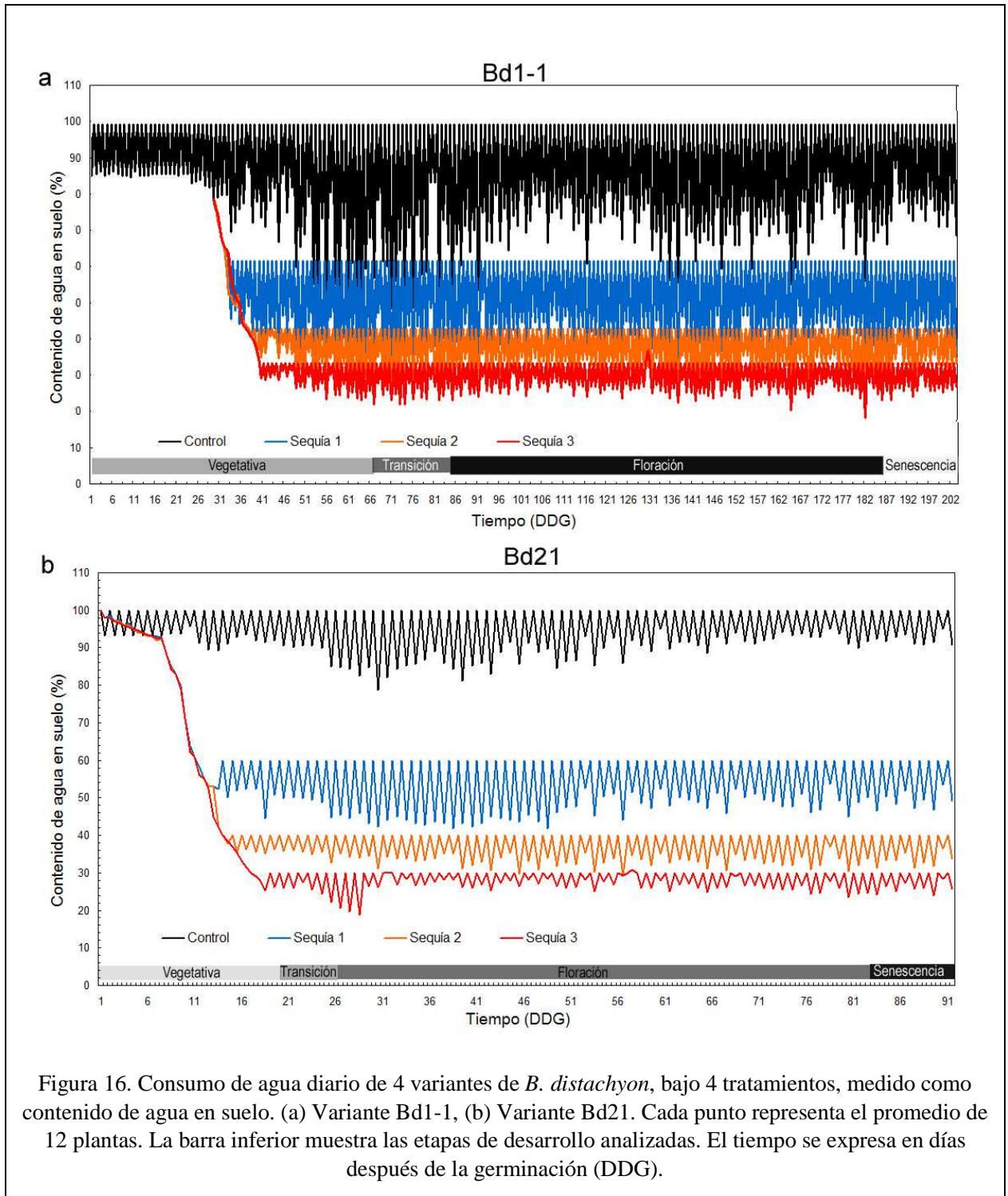
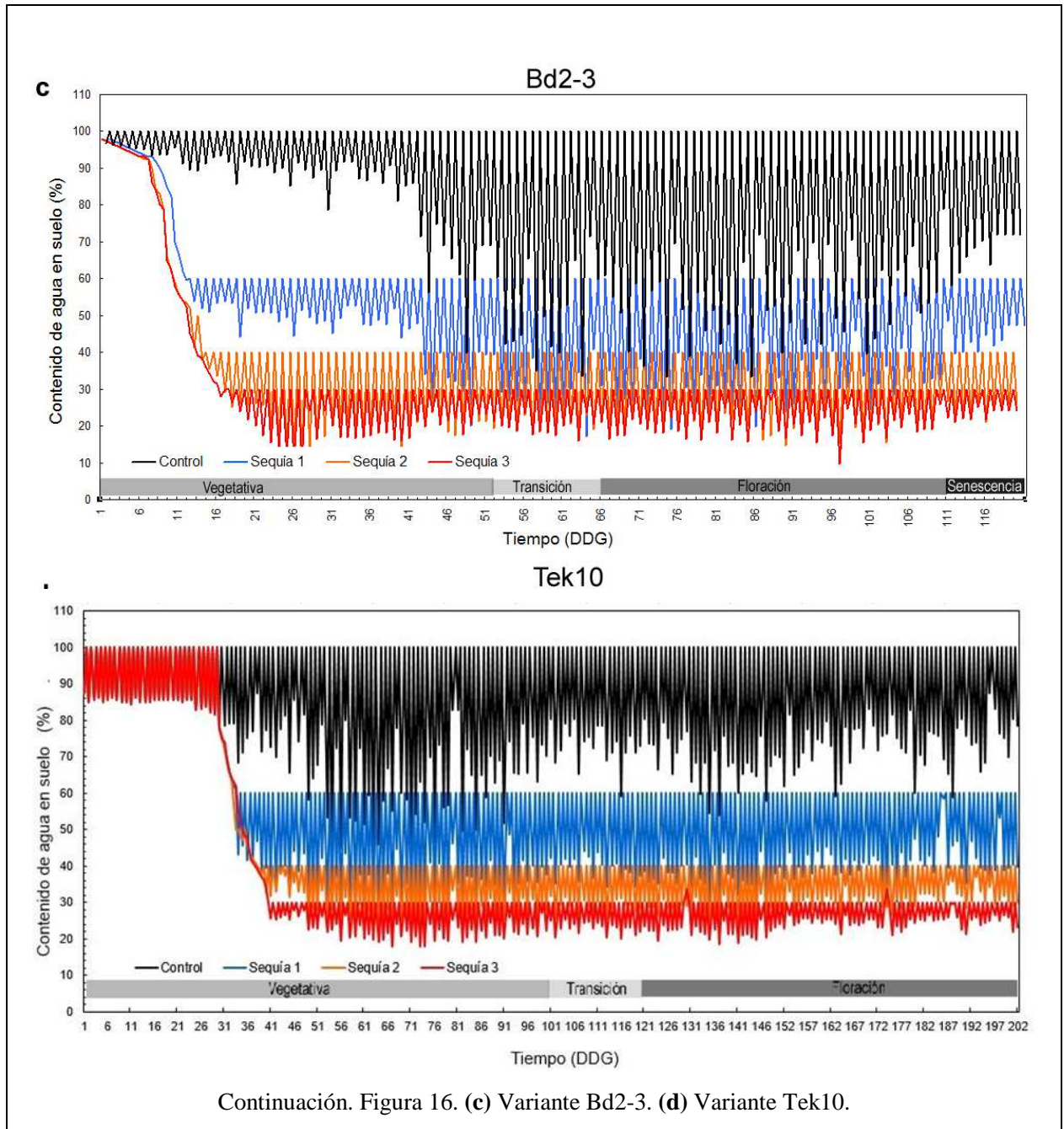


Figura 16. Consumo de agua diario de 4 variantes de *B. distachyon*, bajo 4 tratamientos, medido como contenido de agua en suelo. (a) Variante Bd1-1, (b) Variante Bd21. Cada punto representa el promedio de 12 plantas. La barra inferior muestra las etapas de desarrollo analizadas. El tiempo se expresa en días después de la germinación (DDG).



Un caso similar a Bd1-1, en términos de consumo de agua, es la variante Tek10 (Fig. 16d, Tabla 10). Tek10 tiene un gasto máximo de agua en el tratamiento control durante la etapa de transición ( $26.8 \pm 2.3$ ) y floración ( $28.5 \pm 2.1$ ), a niveles similares que Bd1-1 ( $38.1 \pm 1.5$ ) y en la floración ( $30.4 \pm 7.1$ ). La gran acumulación de biomasa que presentó Tek10, al ser la variante que desarrolló mayor número de hojas, ramificaciones y altura, puede explicar sus altos requerimientos de agua.

Tabla 10. Porcentaje de consumo de agua de 4 variantes naturales de *B. distachyon*, bajo 4 tratamientos.

VARIANTE	ETAPA VEGETATIVA				ETAPA TRANSICION				ETAPA FLORACION				SENESCENCIA			
	Control	Sequía 1	Sequía 2	Sequía 3	Control	Sequía 1	Sequía 2	Sequía 3	Control	Sequía 1	Sequía 2	Sequía 3	Control	Sequía 1	Sequía 2	Sequía 3
Bd21	7.7 <sup>a</sup> ± 1.6	9.8 <sup>b</sup> ± 0.5	10.1 <sup>b</sup> ± 0.1	6.9 <sup>c</sup> ± 0.5	14.3 <sup>a</sup> ± 0.8	14.1 <sup>a</sup> ± 0.5	15.8 <sup>b</sup> ± 0.7	16.6 <sup>b</sup> ± 0.9	10.1 <sup>a</sup> ± 0.9	16.8 <sup>b</sup> ± 0.9	12.5 <sup>c</sup> ± 1.1	13.3 <sup>c</sup> ± 1.0	7.9 <sup>a</sup> ± 0.7	10.4 <sup>b</sup> ± 0.6	16.5 <sup>c</sup> ± 1.1	13.8 <sup>d</sup> ± 1.5
Bd2-3	15.4 <sup>a</sup> ± 2.5	15.8 <sup>a</sup> ± 1.5	19.8 <sup>b</sup> ± 1.4	11.4 <sup>c</sup> ± 1.7	46.4 <sup>a</sup> ± 7.4	29.3 <sup>b</sup> ± 1.4	18.5 <sup>c</sup> ± 1.3	9.7 <sup>d</sup> ± 1.4	47.1 <sup>a</sup> ± 11.4	28.7 <sup>b</sup> ± 2.8	19.5 <sup>c</sup> ± 2.7	10.5 <sup>d</sup> ± 3.2	31.5 <sup>a</sup> ± 3.9	16.2 <sup>b</sup> ± 3.1	15.8 <sup>b</sup> ± 1.78	7.2 <sup>c</sup> ± 1.9
Bd1-1	21.5 <sup>a</sup> ± 2.6	23.5 <sup>a</sup> ± 1.8	10.6 <sup>b</sup> ± 0.2	6.6 <sup>c</sup> ± 0.8	38.1 <sup>a</sup> ± 1.5	25.4 <sup>b</sup> ± 1.3	13.4 <sup>c</sup> ± 1.8	9.1 <sup>d</sup> ± 1.2	30.4 <sup>a</sup> ± 7.1	22.5 <sup>b</sup> ± 4.1	12.1 <sup>c</sup> ± 2.7	7.7 <sup>c</sup> ± 2.3	10.4 <sup>a</sup> ± 0.4	22.6 <sup>b</sup> ± 2.5	11.1 <sup>a</sup> ± 2.5	8.0 <sup>c</sup> ± 0.5
TEK10	28.3 <sup>a</sup> ± 2.9	5.8 <sup>b</sup> ± 0.8	10.8 <sup>c</sup> ± 1.3	7.7 <sup>d</sup> ± 2.6	26.8 <sup>a</sup> ± 2.3	21.2 <sup>b</sup> ± 3.3	11.1 <sup>c</sup> ± 1.6	7.2 <sup>d</sup> ± 1.4	28.5 <sup>a</sup> ± 2.1	20.6 <sup>b</sup> ± 4.8	10.5 <sup>c</sup> ± 2.7	6.2 <sup>d</sup> ± 0.6				

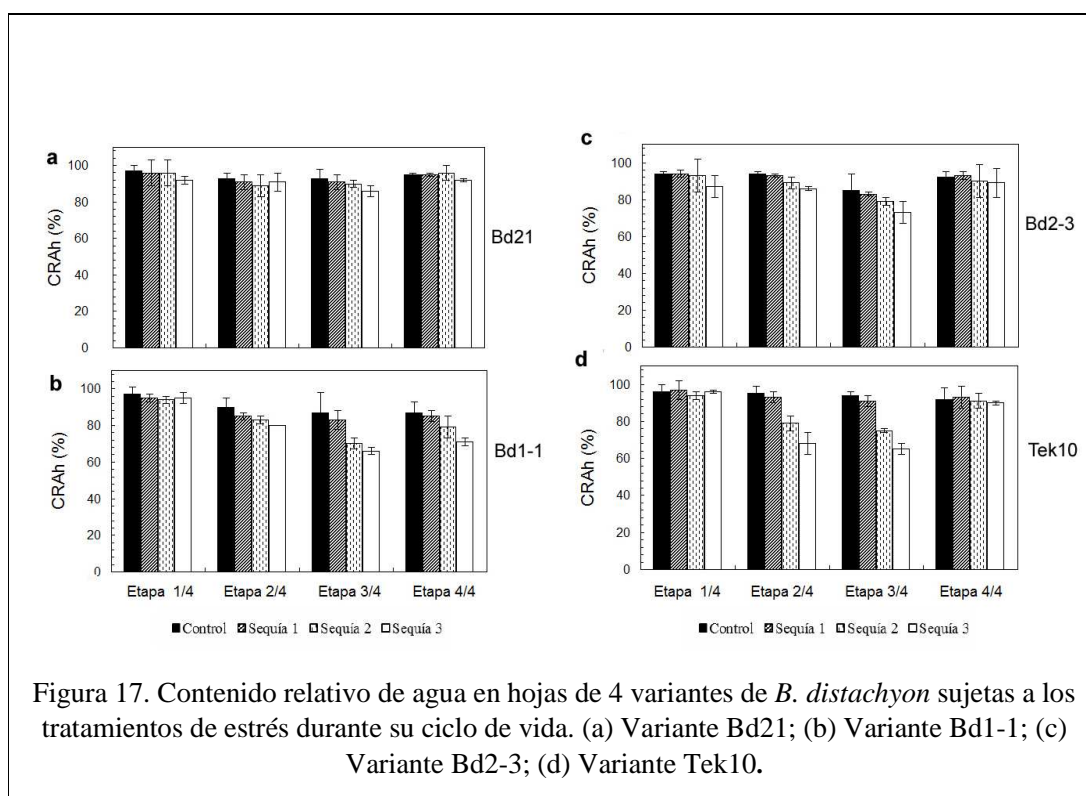
Media ± DS, letras diferentes indican diferencias significativa entre los tratamientos de cada variante ( $P < 0.05$ ), de acuerdo a la prueba de Tukey.

### **7.2.3.2 Contenido relativo de agua en hojas**

El contenido relativo de agua en las hojas (CRAh) es un parámetro fisiológico que permite conocer directamente el estado de hidratación de un tejido vivo basado en su turgencia, por lo que se eligió como medida del estado hídrico de las plantas en este trabajo. Se midió el CRAh en las 4 variantes bajo tratamiento control y de sequía, en los 4 periodos del ciclo de vida.

Las mediciones del CRAh muestran que todas las variantes redujeron en diferentes grados este parámetro en respuesta al estrés (Fig. 17a-d). Por ejemplo, la variante Bd1-1 (Fig. 17b), redujo su contenido de agua en respuesta a los tratamientos de estrés, particularmente cuando las plantas se encontraban en floración (etapa 3/4). Al término de la etapa final (4/4), las diferencias ligeras entre el tratamiento control y los tratamientos de estrés dejaron de ser significativas debido a que las plantas ya habían producido un número estable de inflorescencias y se aplicó tratamiento de rehidratación a niveles normales para permitir el alcance de la etapa de senescencia natural.

La variante Bd2-3 disminuyó el CRAh a partir de la etapa 2/4 en el tratamiento S3 y de en la etapa 3/4 en los tratamientos S2 y S3 (Fig. 17c). Estas reducciones fueron más pronunciadas de lo que se observó en Bd1-1 para dichos niveles de estrés. El tratamiento de rehidratación no logró elevar el CRAh de las plantas sometidas al tratamiento S3 al término de la producción de inflorescencias. En contraste, en la variante Bd21 se observó que ninguno de los tratamientos produjo alteraciones significativas en los valores de CRAh, con excepción de una ligera disminución en el tratamiento S3 en la etapa 3/4 (Fig. 17a). Es probable que la disminución del tamaño de las hojas, y en general, de la planta, haya sido favorable para administrar el agua en condiciones de sequía crónica. Para la variante Tek10 se observó la disminución del CRAh en los tratamientos S2 y S3 durante las etapas 2/4 y 3/4 (Fig. 17d).



#### 7.2.4. Efectos del estrés sobre el tiempo a floración y la producción de inflorescencias y semillas

Con la finalidad de investigar el efecto del estrés por sequía sobre el tiempo a floración en *B. distachyon*, las 4 variantes se analizaron para identificar la progresión de sus etapas de desarrollo y registrar la fecha en que emergió su primera inflorescencia.

A pesar de que al inicio de los experimentos se estratificaron las semillas para sincronizar la germinación, y que una vez germinadas se seleccionaron para que todos los tratamientos iniciaran con plantas en la misma etapa de desarrollo, se observó una amplia variabilidad en el tiempo a floración en cada variante (Fig. 18). Por ejemplo, para Bd21 el intervalo más amplio de tiempo a floración se observó en el estrés S3, con 14 días entre la floración de la primera planta y la última (Fig. 18a). Para Bd1-1, el periodo más amplio se observó en S2, con 35 días de diferencia (Fig.



18b). Para Tek10 se registró el intervalo más amplio en el tratamiento control, con 34 días (Fig. 18d). Para Bd2-3 se registró 21 días como el intervalo más amplio, en el tratamiento S1 (Fig. 18c). Estos resultados muestran que las plantas de ciclo de vida largo (Bd1-1 y Tek10) presentan un intervalo más amplio de tiempo a floración en alguno de los tratamientos, seguidas por Bd2-3 con 21 días y Bd21 con 24.

Aunque esta situación hizo difícil comparar cuantitativamente los efectos de los tratamientos sobre el tiempo a floración, fue posible realizar un análisis cualitativo que permitió detectar dos tipos de respuesta en *B. distachyon*. El primero consistió en el adelanto de la floración en las variantes Bd1-1, Bd2-3 y Tek10, una respuesta típica de la estrategia de escape (Fig. 18b-d). Las variantes Bd1-1 y Bd2-3 lograron adelantar la floración en los tratamientos S1 y S2. Sin embargo, para Bd2-3, el adelanto de la floración no fue tan marcado en el nivel de sequía S3. Para Bd1-1, el nivel de estrés S3 provocó el efecto contrario, resultando en el retraso de la floración (Fig. 18b, panel inferior). Debido a su amplio margen de variabilidad en el tiempo a floración en el tratamiento control, la variante Tek10 mostró un perfil de floración difícil de analizar. A pesar de este inconveniente fue posible observar que la mayor densidad de plantas florecieron en forma anticipada en los tratamientos de estrés S1 y S2, mientras que S3 indujo el retraso de la floración (Fig. 18d), en forma similar a Bd1-1.

Con lo anterior mencionado, para la variante Bd21 no se registró diferencia significativa entre el tratamiento de sequía 1 ( $29.4 \pm 3.2$ ), sequía 2 ( $31.41 \pm 3.36$ ) y el control ( $28.42 \pm 1.78$ ). Sin embargo, se registró un retraso estadísticamente significativo en el estrés por sequía 3 ( $35.33 \pm 4.74$ ), verificado mediante el análisis de varianza de Dunnet. Por otro lado en la variante Tek-10, las plantas control florecieron alrededor de los 70 y 100 días ( $90 \pm 10.63$ ). Con respecto al estrés tipo 1 ( $78 \pm 4.97$ ) y estrés 2 ( $76 \pm 4.26$ ) se observó un adelanto en la floración de al menos 10 días. En contraste, el estrés 3 ocasionó el retraso de la floración ( $97 \pm 7.84$ ). En cuanto a la variante de floración temprana Bd2-3, la floración se presentó adelantada en los tres casos en respuesta a la sequía, es decir, la floración en el tratamiento control ocurrió a los días  $64 \pm 5.84$ , mientras que en el estrés por sequía 1 fue de  $44 \pm 6.69$ , en sequía 2, de  $45 \pm 6.89$ , y en el estrés severo S3, de  $56 \pm 4.40$ .

En general, los resultados obtenidos del análisis del tiempo a floración indican que la respuesta de escape podría estar favorecida en las plantas que presentan un ciclo de vida largo, como son Bd1-1 y Tek10. Bd2-3, con un ciclo medianamente largo también presenta esta estrategia. En cambio, Bd21, que posee el ciclo más corto entre las variantes estudiadas, no adelanta la floración.

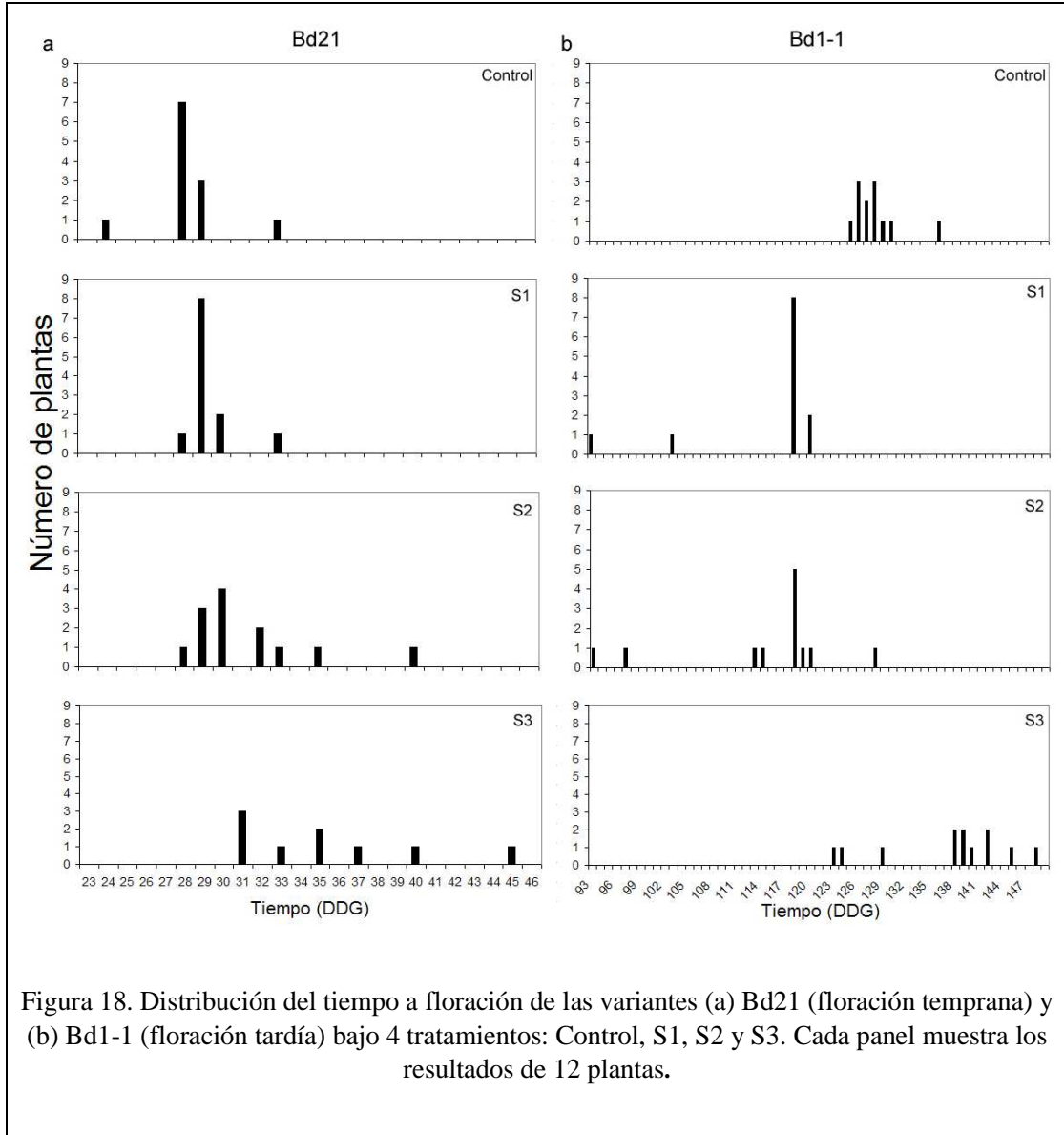
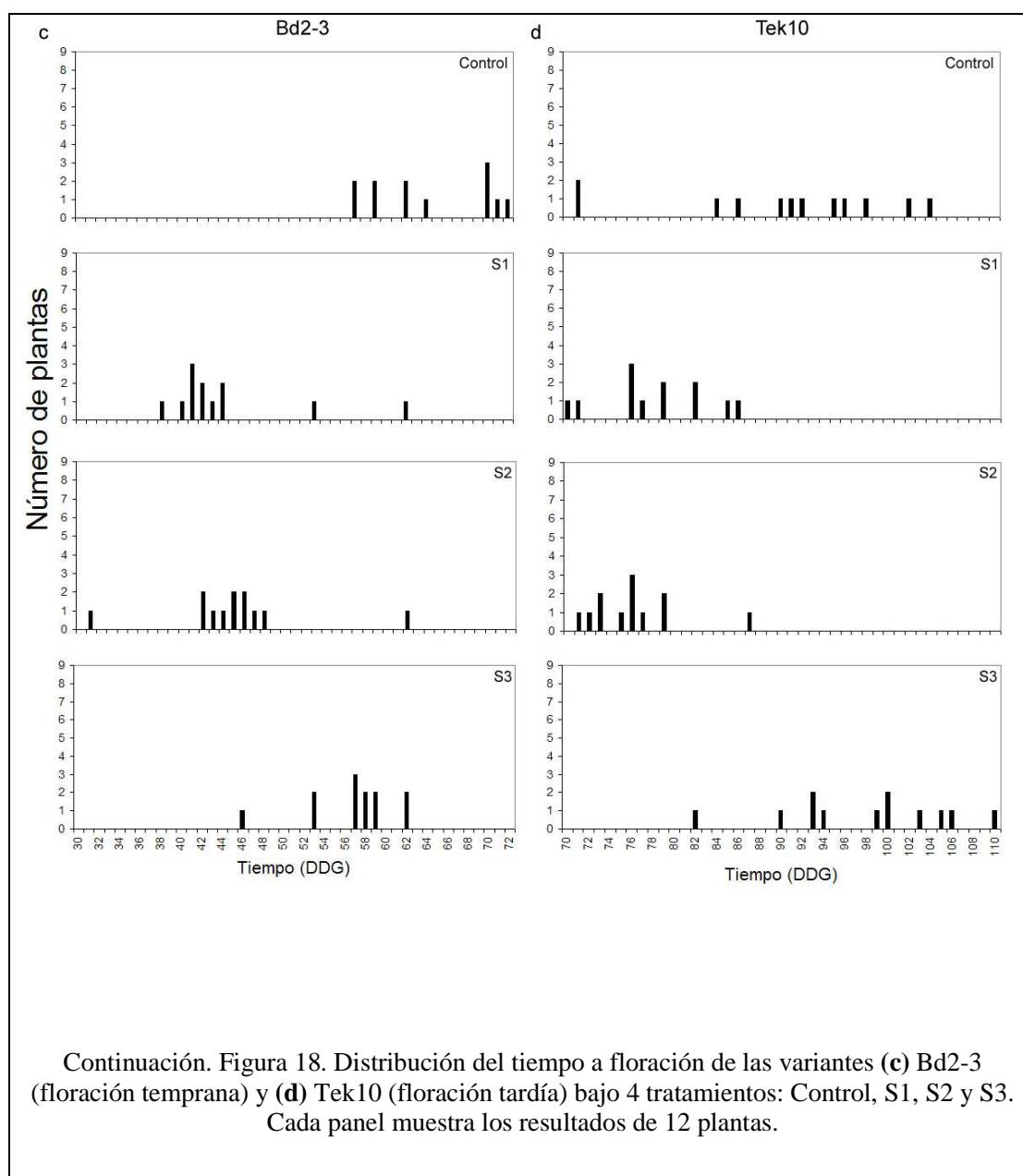


Figura 18. Distribución del tiempo a floración de las variantes (a) Bd21 (floración temprana) y (b) Bd1-1 (floración tardía) bajo 4 tratamientos: Control, S1, S2 y S3. Cada panel muestra los resultados de 12 plantas.



Adicionalmente, se analizó la producción de inflorescencias en las variantes de *B. distachyon* bajo los diferentes tratamientos. En la Fig. 19 se muestran las inflorescencias de las variantes en estudio. Los resultados muestran que los tratamientos de sequía ocasionaron la disminución en la producción de inflorescencias en todas las variantes, en forma dependiente de la intensidad del tratamiento. A mayor intensidad de tratamiento, menor el número de inflorescencias (Fig. 20).



Figura 19. Aspecto de inflorescencias secas de las 4 variantes de *B. distachyon*.

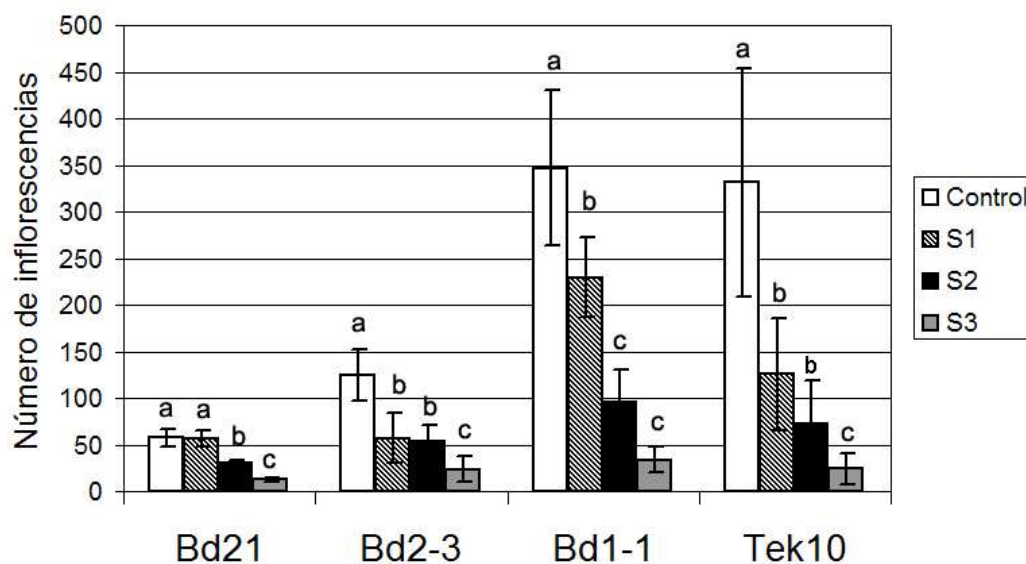
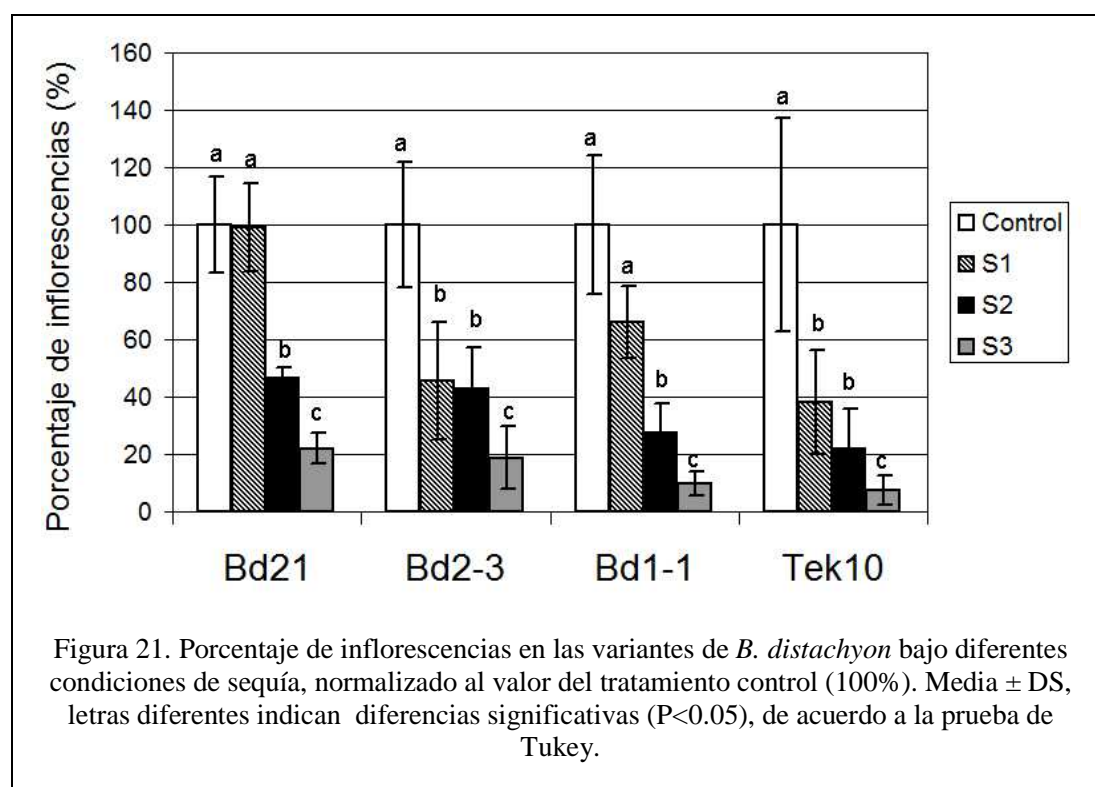


Figura 20. Producción de inflorescencias en 4 variantes de *B. distachyon* bajo diferentes niveles de estrés hídrico. Media  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), de acuerdo a la prueba de Tukey.

Las variantes con la mayor producción de inflorescencias fueron Bd1-1 y Tek10, seguidas por Bd2-3. La variante con la menor producción de inflorescencias fue Bd21 (Fig. 20). De acuerdo a estos resultados, el número total de inflorescencias producidas está directamente relacionado con la duración del ciclo de vida de cada variante. Estos datos también muestran que a medida que

aumenta el tiempo de vida, las variaciones en el número de inflorescencias se hacen mayores, como lo indican las desviaciones del promedio del número de inflorescencias en las variantes de ciclo de vida largo (Fig. 20).

Por otra parte, en la Fig. 21 se muestra el porcentaje de producción de inflorescencias de cada una de las variantes, relativo al tratamiento control. En la variante Bd21 se registraron diferencias significativas en la producción de inflorescencias en el tratamiento de sequía 2 y 3 con respecto al control ( $46\pm 3.5$  y  $22\pm 5.25$ , respectivamente). En la variante Bd2-3 se observaron resultados similares, con una reducción en la producción de inflorescencias de  $18.6.4\pm 10$  en el tratamiento de sequía 3. Las variantes más afectadas en la producción de inflorescencias fueron Bd1-1 y Tek10, que presentaron disminuciones significativas en la producción de inflorescencias en el tratamiento de sequía 3, de  $9.8\pm 4$  y  $7.3\pm 5$ , respectivamente.



Uno de los parámetros más importantes de la tolerancia a la sequía es la productividad de semillas. Si bien, la producción de inflorescencias puede ser indicativo del éxito reproductivo de una planta,

la formación de sus semillas es un proceso determinante. En la Fig. 22 se muestran las semillas producidas por las variantes bajo estudio.



Los tratamientos de sequía aplicados en este trabajo provocaron alteraciones en la productividad de semillas en todas las variantes analizadas (Fig. 23, Tabla 11). Las variantes Bd21 y Bd2-3 sufrieron disminución en la producción de semillas a medida que el tratamiento de estrés aumentaba en severidad, con diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos (Fig. 23, Tabla 11). Paradójicamente, en las variantes Bd1-1 y Tek10 esta tendencia se observó a la inversa, presentando una mayor producción de semillas en el tratamiento de sequía 2 y 3, comparado con el tratamiento control (Fig. 23, Tabla 11).

Haciendo un análisis en general, puede observarse que las variantes de floración temprana (Bd21 y Bd2-3) resultaron ser más productivas, aunque los tratamientos de sequía causaron disminución en la producción de semillas. En cambio, las variantes de ciclo de vida largo (Bd1-1 y Tek10), a pesar de que mostraron baja productividad en condiciones control, presentaron una tendencia clara a aumentar la producción de semillas en los tratamientos de estrés. Tek10, la variante con menor productividad de semillas en el tratamiento control, logró incluso superar la productividad del resto de variantes en el tratamiento S3 (Fig. 23, Tabla 11).

Al analizar el número de semillas producidas por cada una de las variantes, no se observó una asociación directa de este parámetro con el número de inflorescencias. Bd1-1 y Tek10 produjeron el mayor número de inflorescencias en el tratamiento control (Fig. 20). Sin embargo, fueron las que

produjeron el menor número de semillas (Fig. 23) debido a que la mayor parte de las inflorescencias estaban vacías.

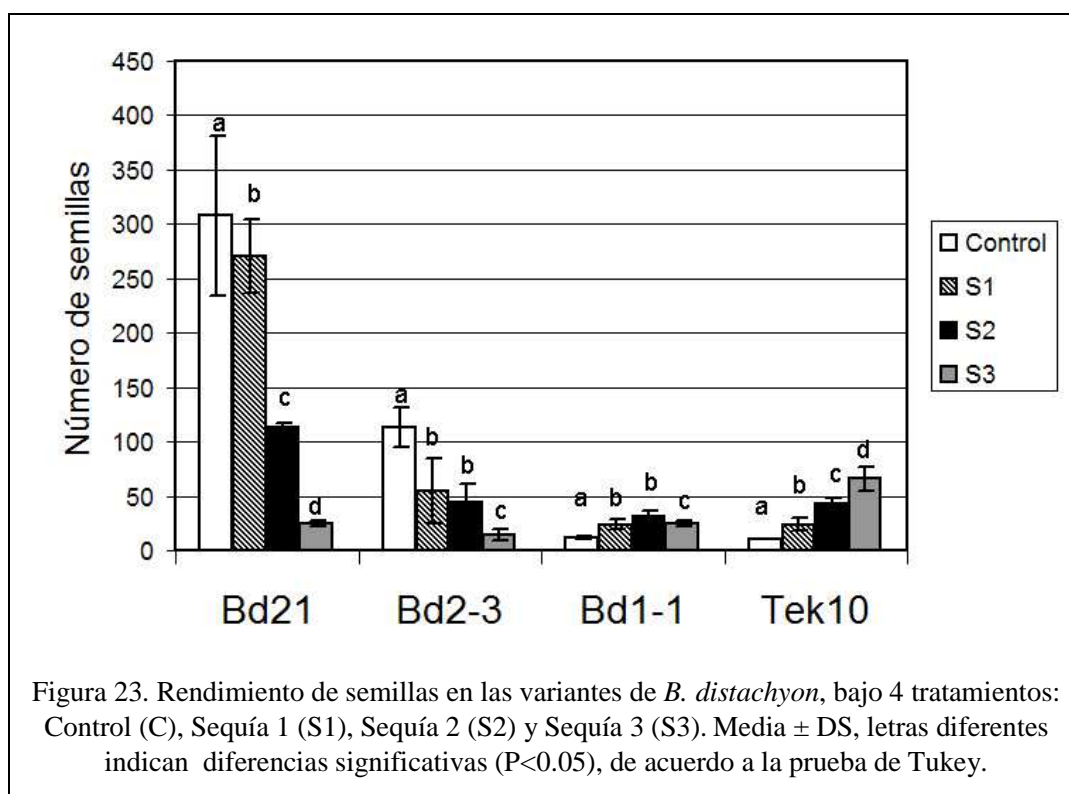


Tabla 11. Producción de semillas las variantes de *B. distachyon* bajo diferentes condiciones de sequía.

Tratamiento / Variante	Producción de semillas			
	Bd21	Bd2-3	Bd1-1	Tek10
<b>Control</b>	307.9 ± 73.4 <sup>a</sup> (100)	113.4 ± 18.5 <sup>a</sup> (100)	12.1 ± 1.6.1 <sup>a</sup> (100)	10.1 ± 0.2 <sup>a</sup> (100)
<b>Sequía 1</b>	269.9 ± 33.8 <sup>b</sup> (87.6)	54.3 ± 29.6 <sup>b</sup> (47.8)	24.1 ± 4.1 <sup>b</sup> (199)	23.8 ± 5.5 <sup>b</sup> (235)
<b>Sequía 2</b>	113.2 ± 3.7 <sup>c</sup> (36.7)	43.8 ± 16.8 <sup>b</sup> (38.6)	31 ± 5.7 <sup>c</sup> (256)	43.1 ± 4.8 <sup>c</sup> (426)
<b>Sequía 3</b>	24.5 ± 3.0 <sup>d</sup> (7.9)	13.9 ± 5.4 <sup>c</sup> (12.25)	25 ± 2.9 <sup>c</sup> (208)	65.9 ± 10.8 <sup>d</sup> (652)

Media ± DS, letras diferentes indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ), de acuerdo a la prueba de Tukey. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de producción, relativos al tratamiento control (100%)

### 7.3 Etapa 3. Análisis molecular

#### 7.3.1 Caracterización de las muestras empleadas en el análisis molecular

Para el análisis molecular de la floración en *B. distachyon* se eligió a la variante Bd21 debido a que posee un ciclo de vida corto y por tanto su floración ocurre en menor tiempo. Con el objeto de establecer una relación entre el estrés por sequía y el tiempo a floración, se investigaron los cambios de expresión de dos genes clave a lo largo de 24h en la proximidad de la floración, empleando dos fotoperiodos en condiciones sequía y control. Los detalles de estos experimentos se describen en la sección 6.5.

Las determinaciones de CRAh de las plantas al momento de la colecta para el análisis molecular muestran que las plantas en el fotoperiodo de 20h luz / 4h oscuridad presentaron niveles bajos en este parámetro, incluso en el tratamiento control, cuando se comparó con el de fotoperiodo de 16h luz / 8h oscuridad (Fig. 24). Sin embargo, el bajo contenido de agua fue similar en S1 y S2, y sólo se encontró diferencia en el tratamiento S3. En el fotoperiodo regular las plantas presentaron CRAh más alto, mismo que disminuyó en forma dependiente de la intensidad del tratamiento (Fig. 24).

En la Fig. 25 se muestran imágenes de las plantas empleadas en el análisis molecular. Al momento de la colecta, las plantas presentaron 22 y 17 hojas para días regulares y largos en el tratamiento control, respectivamente (Tabla 12). Este parámetro disminuyó en respuesta a los tratamientos de estrés en ambos fotoperiodos. Las plantas se colectaron en diferentes tiempos de acuerdo al fotoperiodo, ya que con experimentos anteriores la floración se presenta a diferentes tiempos. Por tal razón, las plantas de días regulares se colectaron a los 25 DDG para el fotoperiodo largo, y a los 33 DDG para el fotoperiodo regular, aproximadamente 1-3 días antes de que ocurriera la floración para ambos casos. De acuerdo con esto, se observan diferencias en el número de hojas al momento de la colecta (Tabla 12). Además las plantas en condiciones de fotoperiodo regular mostraban una imagen más saludable, incluso desde las primeras etapas de crecimiento (Fig. 25).

En cuanto al número de ramificaciones y la altura de las plantas, también se registraron disminuciones en los tratamientos de sequía en ambos fotoperiodos (Tabla 12). En un grupo de plantas Bd21 que no se colectaron y continuaron con los tratamientos, la floración se registró al día 26 DDG en fotoperiodo largo y al 35-40 DDG en fotoperiodo regular.



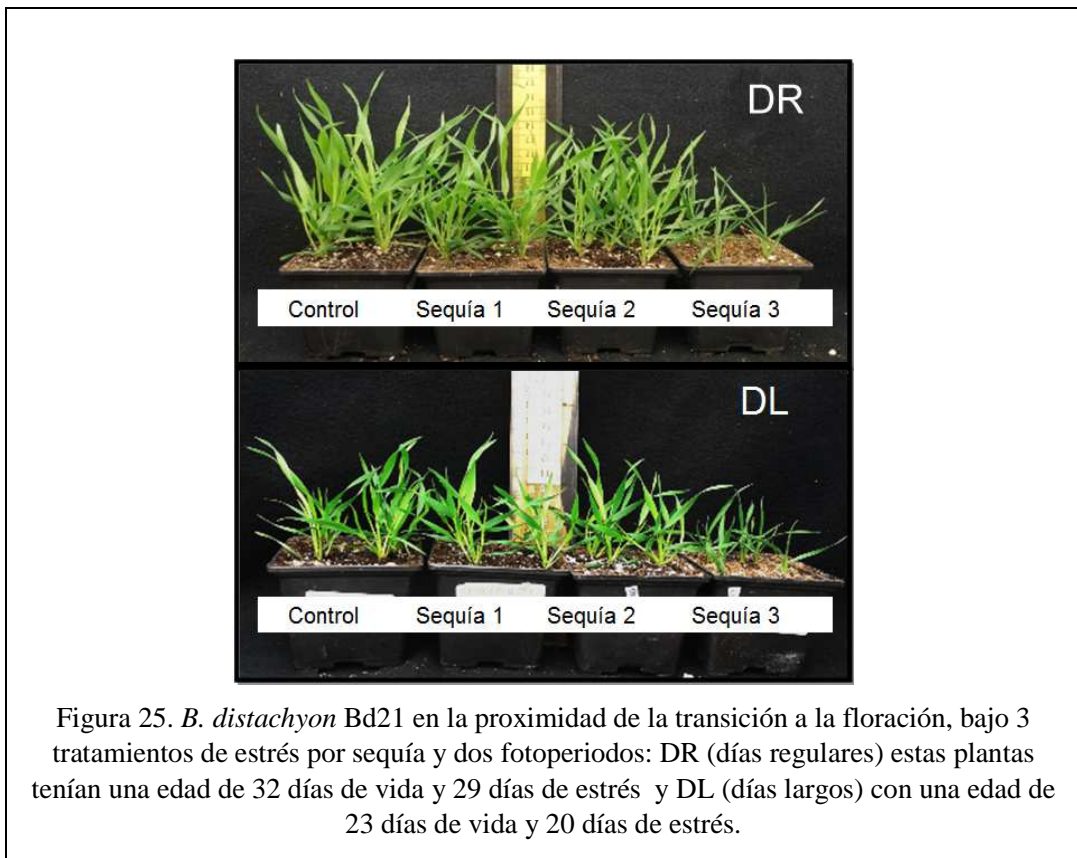
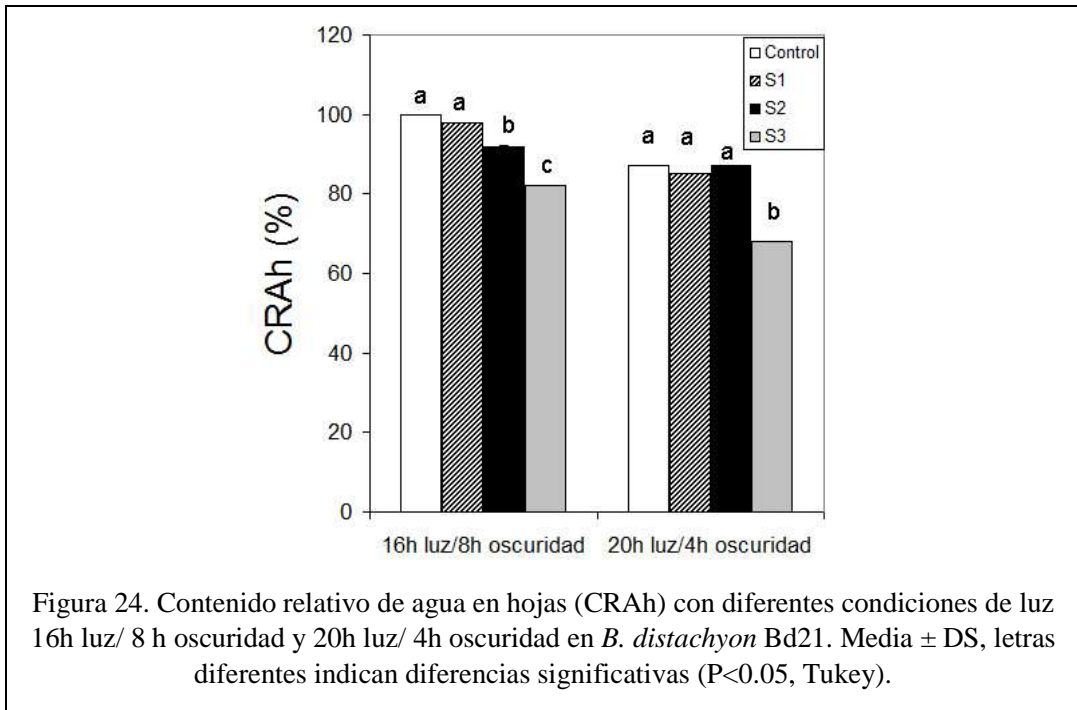


Tabla 12. Parámetros fisiológicos de desarrollo en *B. distachyon* Bd21 bajo dos fotoperiodos.

Bd21	Número de hojas		Número de ramificaciones		Altura (cm)	
	DR	DL	DR	DL	DR	DL
Control	22±0.8 <sup>a</sup>	17,0± 1.8 <sup>a</sup>	6.8±0.5 <sup>a</sup>	4.3±0.5 <sup>a</sup>	3.8±0.2 <sup>a</sup>	3.1±0.3 <sup>a</sup>
Sequía 1	18.5±1.3 <sup>b</sup>	15,5± 2.5 <sup>a</sup>	6.3±0.5 <sup>a</sup>	4±0 <sup>a,b</sup>	3.2±0.2 <sup>b</sup>	3.1±0.4 <sup>b</sup>
Sequía 2	14±1.4 <sup>c</sup>	14,0±3.6 <sup>b</sup>	4.3±1 <sup>b</sup>	3.7±0.6 <sup>b</sup>	2.5±0.1 <sup>c</sup>	2.1±0.4 <sup>c</sup>
Sequía 3	8.8±0.5 <sup>d</sup>	7± 1.5 <sup>c</sup>	3±0 <sup>c</sup>	2.3±0.6 <sup>c</sup>	1.3±0.1 <sup>d</sup>	0.8±0.2 <sup>d</sup>

Media ± DS, letras diferentes indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ), de acuerdo a la prueba de Tukey.  
DR (días regulares), DL (días largos).

Las muestras colectadas se procesaron para extracción de RNA total. Después de la extracción, los RNAs se resolvieron en un gel de agarosa para observar su integridad y calidad. En la Fig. 26 se observan los RNAs extraídos. Se puede apreciar la integridad de las bandas ribosomales mayores, indicativo de que las muestras no estuvieron expuestas a la degradación. Por lo tanto, se pudo continuar con los procedimientos de caracterización molecular.

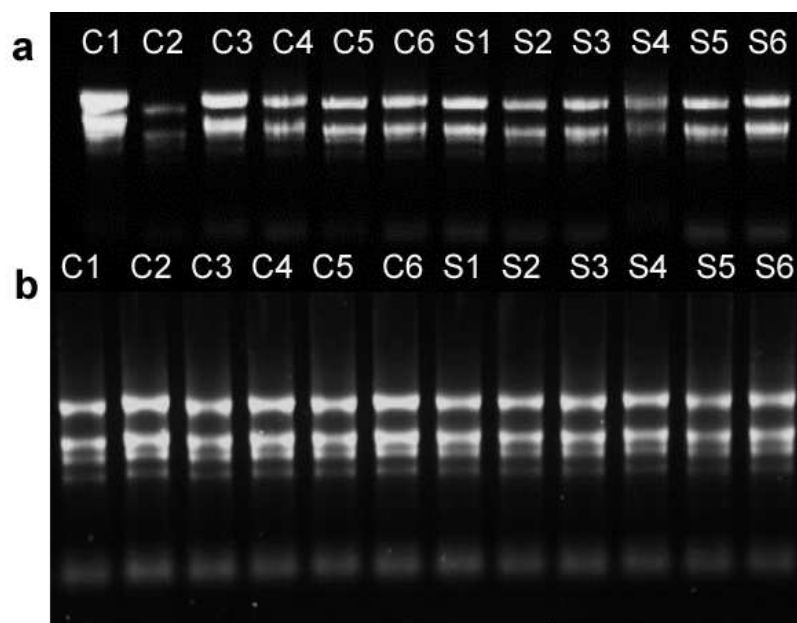


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% desnaturalizante, de RNAs totales extraídos de *B. distachyon*. C1: muestra control del tiempo 1-6, S1: muestra de estrés por sequía severa del tiempo 1-6. (a) RNAs purificados de Bd21 en fotoperiodo de días regulares. (b) RNAs purificados de Bd21 en fotoperiodo de días largos.

### 7.3.2 Análisis de expresión de GIGANTEA (*GI*) y *SOC1*

La floración está regulada genéticamente por una combinación de estímulos exógenos y endógenos en las plantas. Con el objeto de investigar si las alteraciones en el tiempo a floración durante el estrés por sequía están determinadas por genes clave en las rutas de floración, se eligieron dos genes, *GIGANTEA (GI)* y *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1)*, para analizar su perfil de expresión en la respuesta al estrés, mediante PCR cuantitativa, en muestras provenientes de las plantas control y del tratamiento de sequía 2, en 6-7 puntos del día, de acuerdo a lo especificado en la sección respectiva en Materiales y Métodos.

En la Fig. 27a-d se presentan los resultados de la PCR cuantitativa. Los dos genes analizados se expresaron a niveles detectables en todos los puntos muestreados. En el caso de *GI* se observó que al término de la fase oscura se registraron los niveles mínimos de acumulación del transcrito. Los niveles de *GI* aumentaron gradualmente a medida que avanzaba la fase de luz en ambos fotoperiodos y tratamientos (Fig. 27a, b). Sin embargo, los niveles de expresión de *GI* fueron

significativamente superiores en los tratamientos de sequía, independientemente del fotoperiodo. Ahí se observa que para *GI* las mayores diferencias entre el tratamiento de sequía y el control se manifestaron a las 12 y 16 h de luz para el fotoperiodo regular y a las 16 y 20 h de luz para el fotoperiodo largo (Fig. 27a, b).

En lo que respecta al gen *SOCI*, también se observaron cambios a lo largo de los fotoperiodos. En el fotoperiodo regular se observó la máxima acumulación en el tratamiento control a las 12h de luz y a la mitad de la fase de oscuridad (Fig. 27c). No obstante, esto no fue consistente en el fotoperiodo largo, donde se alcanzaron niveles similarmente altos al inicio del experimento (inicio de la fase de luz) (Fig. 27d). A pesar de que se esperaba que *SOCI* presentara una regulación más rítmica a lo largo del día como ocurre con los genes de floración de la planta *Arabidopsis thaliana*), de acuerdo a lo reportado por Riboni *et al.*, (2013), es probable que el fotoperiodo prolongado y los tratamientos de estrés hayan alterado su patrón normal de expresión. La edad de las plantas y el tipo de tejido colectado también pudo jugar un papel determinante en estas observaciones.

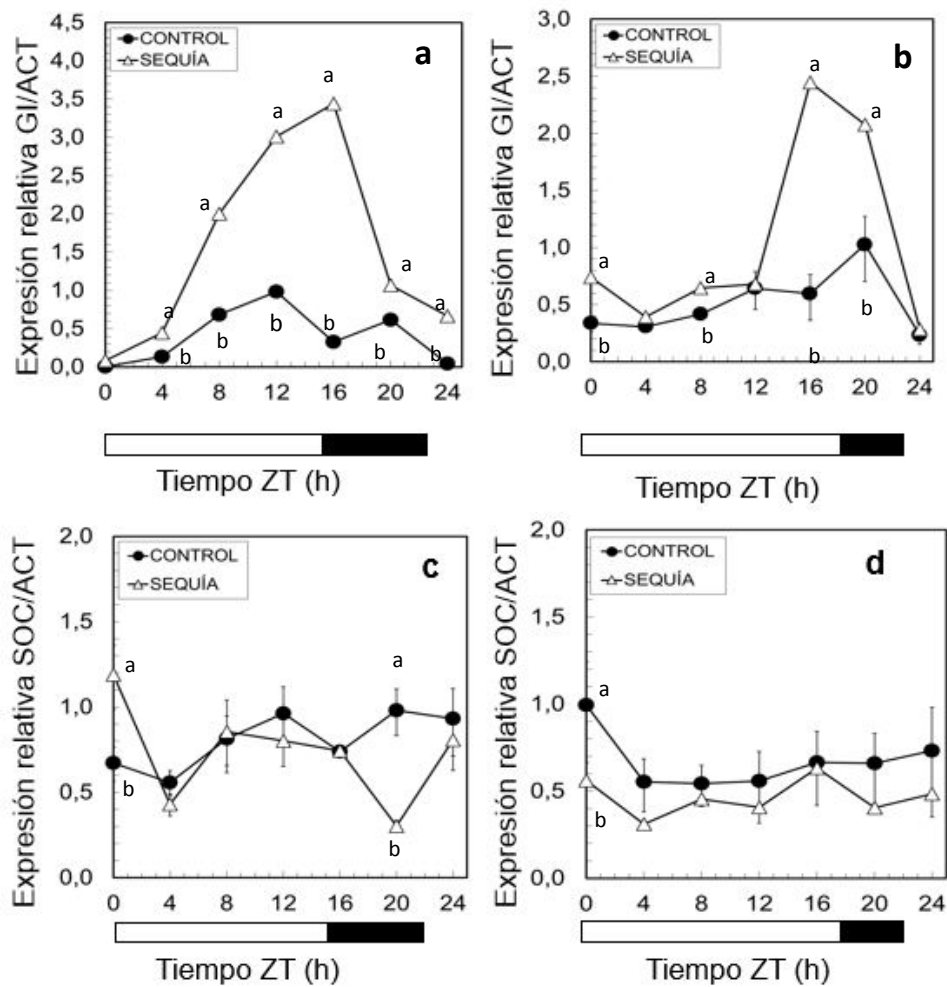


Figura 27. Cinética de expresión de *GI* y *SOC1* en condiciones control ● y sequía 3 △, bajo dos fotoperiodos. (a) y (c), fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad. Las hojas y tallos de las plantas se colectaron a los 25 DDG. (b) y (d), fotoperiodo de 20h luz/4h oscuridad. Las hojas y tallos de las plantas se colectaron a los 33 DDG. Las letras diferentes representan una diferencia significativa entre los dos tratamientos con respecto al tiempo ( $P < 0.05$ ), de acuerdo a la prueba de *t* de Student.

### III. DISCUSIÓN

#### 8.1 Condiciones adecuadas para el desarrollo de *B. distachyon*

La planta *B. distachyon* se ha propuesto como un modelo útil para el estudio de procesos biológicos en plantas monocotiledóneas ya que es una planta de ciclo de vida corto y genoma pequeño totalmente secuenciado, su cultivo ocupa poco espacio y no requiere de condiciones de crecimiento especiales.

En este trabajo se abordó el estudio de 4 variantes naturales de *B. distachyon* con el objetivo de caracterizar su perfil temporal de crecimiento en las condiciones de cultivo más favorables. Debido a que este fue el primer trabajo realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNPA con *B. distachyon*, fue necesario identificar y establecer las condiciones ambientales más favorables para el cultivo de la planta y confirmar que los tiempos en que se alcanzan las fases de desarrollo estuvieran de acuerdo con lo reportado en la literatura.

El fotoperiodo, la temperatura y la intensidad de la luz son condiciones ambientales importantes para el desarrollo adecuado de las plantas. En el caso de *B. distachyon*, los reportes disponibles al inicio de este trabajo empleaban un fotoperiodo de 20h de luz y 4h de oscuridad para optimizar el tiempo a floración. Dado que gran parte de los estudios de *B. distachyon* están basados en dicho fotoperiodo, se decidió aplicarlo para obtener resultados comparables. De igual forma, la temperatura de crecimiento óptima se determinó con base en lo reportado.

En cuanto a la intensidad de la luz, los trabajos especificaban una diversidad de intensidades que iban desde los 50, 100 y hasta los 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Por tal razón se probaron tres intensidades de luz, seleccionando la mayor, 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , como la más favorable con base en la observación de parámetros de crecimiento en tres variantes naturales probadas (Figs. 9 y 10).

## 8.2 Variación natural de la duración del ciclo de vida en *B. distachyon*

Con las condiciones de crecimiento más favorables, se estableció el cultivo para identificar las diferentes etapas de desarrollo de *B. distachyon* y cuantificar la duración de su ciclo de vida. Con esto fue posible confirmar que el ciclo de vida de la variante Bd21 es corto (Figs. 11 y 12), y que el tiempo a floración llega unas cuantas semanas después de la germinación. Aunque su etapa vegetativa es corta, durante ese tiempo logra desarrollar biomasa suficiente para sostener la producción de inflorescencias y semillas. Por otra parte, la variante Bd2-3 tiene tiempo a floración y ciclo de vida intermedios. En el extremo de la duración del ciclo de vida se encuentran Bd1-1. Esta variante requiere tiempos mayores para florecer, tal como se ha confirmado en reportes previos (Schwartz *et al.*, 2010) y logra acumular una gran cantidad de hojas y ramificaciones antes de que ocurra la aparición de las primeras inflorescencias.

La duración de la etapa vegetativa en todas las variantes está directamente relacionada con la cantidad de biomasa que logran acumular, cuantificada en número de hojas y ramificaciones. La variante Bd21 acumula la menor cantidad de hojas, seguida por Bd2-3. Finalmente, correspondiendo a su largo ciclo de vida, Bd1-1 presentó la mayor cantidad de biomasa vegetativa (Fig. 12).

Los tiempos que se registraron para el ciclo de vida de cada una de las variantes analizadas en este trabajo concuerdan con reportes previos, lo que indica que las condiciones de crecimiento son las más adecuadas, o al menos, permiten comparaciones con trabajos publicados (Schwartz *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2011). Sin embargo, en el caso de las variantes Bd1-1 y Tek10, es importante observar que éstas requieren un periodo de vernalización para acelerar la floración (Ream *et al.*, 2014). En el caso de este trabajo, no se aplicaron tratamientos de vernalización para evitar la inducción de la floración debida al frío, de forma que si llegaba a ocurrir algún adelanto o atraso en la floración, pudiera atribuirse directamente a los tratamientos de sequía.

### 8.3 Ajustes fisiológicos inducidos por la sequía en variantes naturales de *B. distachyon*

La diversidad de ambientes que ha colonizado *B. distachyon* es un reflejo de su capacidad de adaptación ante los retos ambientales. Esta capacidad se debe a mecanismos constitutivos cuyo estudio puede abordarse mediante el análisis de variantes naturales. Además de estos mecanismos, existe en *B. distachyon* una amplia capacidad de plasticidad fenotípica que le permite ajustar su fisiología y morfología para sobrevivir a condiciones de estrés. En este caso, las variantes naturales también son un recurso valioso para explorar el potencial de plasticidad presente en *B. distachyon* y para medir sus efectos en términos de desarrollo y productividad (Draper *et al.*, 2001).

En este trabajo se propuso analizar la influencia que tiene el déficit hídrico sobre la capacidad de 4 variantes naturales de *B. distachyon* para realizar ajustes en el ciclo de vida que les permitan sobrevivir al estrés. Debido a que las variantes presentaron ciclos de vida de distinta duración, se consideró dividir el ciclo de vida de cada planta en 4 partes, para permitir que el primer cuarto de vida las plantas germinaran y crecieran adecuadamente, y para iniciar los tratamientos de sequía cuando comenzara el segundo cuarto.

En un trabajo publicado recientemente por Schmalenbach *et al.* (2014) se analizó el efecto de la sequía sobre el tiempo a floración y el crecimiento en líneas de *Arabidopsis*. Aunque en dicho trabajo se compararon líneas con ciclos de vida de diferente duración, los tratamientos se aplicaron al mismo tiempo a todas las líneas. De acuerdo a los propios autores, esto pudo haber puesto en desventaja a las variantes de floración temprana, ya que es posible que el estrés se iniciara cuando la planta ya estaba muy próxima a la floración. Por otra parte, si el inicio de los tratamientos se hubiera ajustado a la variante de ciclo más corto, el tratamiento se iniciaría de forma precoz en las plantas de ciclo largo, haciendo que el tratamiento de estrés fuera más prolongado y causando efectos que harían difícil la comparación. Es por esto que en este trabajo se aplicaron los tratamientos en tiempos proporcionales al ciclo de vida de cada variante.

De acuerdo a Skirycz *et al.*, (2011), los métodos más ampliamente utilizados en los laboratorios para evaluar la tolerancia a sequía no son los más adecuados, pues el tipo de estrés que se aplica no permite identificar a las plantas que podrían tolerar la sequía en condiciones más naturales. El tipo de estrés aplicado en el presente trabajo intenta simular las condiciones que las plantas experimentan en el campo. En las condiciones naturales, las plantas no sufren sequía severa rápidamente. La capacidad de retención de agua por parte del suelo, y la posibilidad de obtener más



agua del suelo profundo, hacen que el estrés tome un tiempo prolongado para alcanzar niveles críticos.

Atendiendo a lo anterior, durante los 3 últimos cuartos de vida de cada variante se aplicaron tres niveles de estrés en forma crónica, ajustando a diario el nivel de agua en el sustrato y evitando la deshidratación drástica. Así, fue posible observar respuestas al estrés que no ocurrirían de inmediato si se aplicara un tratamiento de choque de deshidratación o de sequía progresiva que culmina con un nivel severo de déficit hídrico en corto tiempo.

En los experimentos realizados se observó que todas las variantes disminuyeron el número de hojas y ramificaciones así como su altura en respuesta al estrés, y que la intensidad de dichas disminuciones está relacionada con el nivel de estrés aplicado (Fig. 14, Tabla 9). Analizando el final del ciclo de vida de cada variante, en el tratamiento de sequía de mayor intensidad (S3), se observa que las variantes Bd21 y Tek10 sufrieron las mayores disminuciones en altura y número de hojas y ramificaciones (Fig. 15). Esto indica que aparentemente no existe una relación directa entre la mayor reducción de los parámetros fisiológicos y la duración del ciclo de vida, puesto que Bd21 es de ciclo corto y Tek10 de ciclo largo. Tampoco parece estar relacionado con la altura basal de la planta, ya que Bd21 fue la variante que mostró la menor altura y Tek10 fue la más alta (Fig. 15).

#### **8.4 Administración del agua en *B. distachyon* durante el estrés por sequía**

De acuerdo a los resultados de consumo de agua, se observó que todas las variantes de *B. distachyon* realizaron ajustes en el uso de agua en forma dependiente de la cantidad de agua disponible en el suelo (Fig. 16, Tabla 10). Bajo condiciones de hidratación normal, las variantes Bd1-1 y Bd2-3 presentaron mayores requerimientos de agua durante la etapa de transición de la etapa vegetativa a la floración y durante la floración, mientras que Tek10 presentó unos picos elevados de consumo de agua en la etapa vegetativa previa a la transición. Tanto Bd1-1 y Tek10 desarrollaron gran cantidad de biomasa. Bd2-3 no produjo tanta biomasa como Tek10 pero presentó una altura muy similar (Tabla 9.). En contraparte, Bd21 mostró los menores niveles de consumo de agua, tanto en la condición de hidratación normal como en los tratamientos. Estos resultados indican que las plantas que desarrollan poca biomasa durante su etapa vegetativa libre de estrés, como Bd21, son capaces de administrar de mejor manera el agua disponible cuando sobreviene el

estrés, y que a pesar de que el resto de las variantes también realizan reducciones a su tamaño en respuesta a la sequía, su consumo de agua es más elevado que en Bd21 (Tabla 10).

Por otra parte, las mediciones del CRAh revelaron que a pesar del largo periodo de sequía, las plantas logran ajustar la hidratación de sus tejidos con poca agua disponible (Fig. 17). Este tipo de resultados no son comunes cuando se aplica a las plantas tratamientos de estrés progresivo que no les permiten realizar ajustes para contener la pérdida de agua y en los que el CRAh disminuye considerablemente (Barrera-Figueroa *et al.*, 2007). Tomando en consideración los ajustes en parámetros de crecimiento, el consumo de agua y el CRAh, es claro que las plantas expuestas al estrés que logran limitar eficientemente su crecimiento durante una sequía crónica, administran de mejor forma el agua disponible y logran mantener hidratados sus tejidos, y que esta condición les permite mantener el estado fisiológico para recuperar el estado óptimo de hidratación cuando el agua deja de ser limitante.

### **8.5 Plasticidad del tiempo a floración inducida por sequía en *B. distachyon***

El tiempo a floración es un punto crítico del ciclo de vida de las plantas y es fundamental para garantizar el éxito reproductivo. El conocimiento de los mecanismos y factores que controlan el tiempo a floración ha permanecido como uno de los focos más importantes de investigación en plantas, ya que permitiría la manipulación del ciclo de vida para inducir la formación de frutos y semillas asegurando la productividad, o bien, para reprimir la floración e incrementar la acumulación de biomasa vegetativa, útil en aplicaciones biotecnológicas como la producción de biocombustibles.

En este trabajo se analizó la plasticidad del tiempo a floración de variantes de *B. distachyon* en respuesta a tratamientos de sequía. De acuerdo a los resultados, se reveló que *B. distachyon*, en sus diferentes variantes, posee una amplia capacidad para retrasar o adelantar la floración, dependiendo de la intensidad del estrés (Fig. 18). La variante de ciclo corto, Bd21 (Fig. 18a) presentó una respuesta de atraso de la floración, mientras que la variante de ciclo intermedio (Bd2-3) (Fig. 18c) y las variantes de ciclo largo (Bd1-1 y Tek10) (Fig. 18b, d), adelantaron la floración. Lo anterior sugiere que es posible que la respuesta de escape esté favorecida en plantas que presentan un ciclo de vida largo en *B. distachyon*.

La respuesta de adelanto de la floración por efecto de la sequía, conocida como escape a la sequía, no se ha reportado en *B. distachyon*, por lo que no es posible realizar comparaciones directas de estos resultados. En *Arabidopsis*, se logró inducir el escape a la sequía empleando un estrés crónico muy similar al de este trabajo en etapas de desarrollo tempranas (Riboni *et al.*, 2013). Por lo tanto, se puede esperar que la respuesta de escape a la sequía esté determinada por la etapa de desarrollo de la planta, la intensidad del tratamiento de estrés y su duración. Por los resultados obtenidos, es probable que el corto tiempo de la etapa vegetativa en Bd21 no haya sido suficiente para inducir la respuesta de escape, al contrario de lo que sucedió con las plantas de ciclo más largo, aunque también existe la posibilidad de que este tipo de respuesta no esté presente en Bd21.

### **8.6 Efecto de la sequía en la productividad de semillas de *B. distachyon***

Cuando se analizó el crecimiento de las variantes de *B. distachyon* en condiciones de sequía, se observó que aquellas que desarrollaron mayor cantidad de biomasa (Bd1-1 y Tek10) mantuvieron su ventaja sobre Bd21 en el número de hojas, aún con las reducciones causadas por el estrés. Esto apoya la observación de Skirycz *et al.* (2011), de que las plantas poseen suficientes recursos para sostener tanto la tolerancia a la sequía como la acumulación de biomasa. Adicionalmente, Skirycz *et al.*, (2011) considera que cuando las condiciones de sequía no son tan severas como para poner en riesgo la vida de la planta, las reducciones en la biomasa vegetativa podrían ser contraproducentes y llevarían a pérdidas de rendimiento innecesarias, ya que la biomasa vegetativa es un componente determinante para el rendimiento de semillas. A este respecto, cabe señalar que Bd21 fue la variante que produjo menor cantidad de biomasa vegetativa, tanto en condiciones control como en los tratamientos de sequía, y que además es una de las dos variantes que sufren las mayores reducciones en todos los parámetros fisiológicos registrados (Fig. 15, Tabla 9). También presentó el menor número de inflorescencias (Fig. 20). Atendiendo a la consideración de Skirycz *et al.*, (2011), se esperaría que su rendimiento de semillas se afectara notablemente. Por otra parte, Tek10 y Bd1-1 fueron las que más acumularon biomasa vegetativa, medida por el número de hojas, altura y número de ramificaciones a lo largo de su ciclo completo. Además produjeron los números más altos de inflorescencias (Figs. 20 y 21). Se esperaría que su rendimiento no se afectara significativamente por el estrés.

Paradójicamente, los resultados de la cuantificación de semillas producidas por las variantes en condiciones control y de estrés muestran que Bd21, en contraste con su baja producción de biomasa

vegetativa, fue la de mayor rendimiento de semillas (Fig. 23). Bd2-3 tuvo rendimiento intermedio, mientras que Bd1-1 y Tek10, que acumulan mayor cantidad de biomasa, produjeron los rendimientos de semillas más bajos (Fig. 26, Tabla 11). Sin embargo, en las variantes Bd21 y Bd2-3 la producción de semillas se afectó negativamente en respuesta a los tratamientos de sequía, donde el número de semillas disminuyó con relación a la severidad del estrés (Fig. 23, Tabla 11). Es importante mencionar que el rendimiento de semillas y el número de inflorescencias se determinaron manualmente contando una por una en cada una de las plantas y tomando en cuenta que la inflorescencia y las semillas estuvieran en su etapa de senescencia, y así calcular la media de las 12 plantas en cada uno de los tratamientos (control, sequía 1, sequía 2 y sequía 3).

En contraste con lo anterior, las variantes de ciclo de vida largo (Bd1-1 y Tek10), que tuvieron rendimientos de semilla bajos en condiciones control, aumentaron su productividad en respuesta al estrés (Fig. 23). Tek10, la variante con menor productividad en el tratamiento control, logró incluso superar la productividad del resto de variantes en el tratamiento S3 (Fig. 23, Tabla 11). Estos resultados sugieren que, 1) la acumulación de biomasa vegetativa podría no estar relacionada directamente con la productividad de semillas, 2) que un ciclo de vida corto favorece la productividad y limita las pérdidas por sequía de intensidad leve a intermedia, 3) que ante un ciclo de vida largo, la abundancia de agua podría favorecer la acumulación de biomasa vegetativa comprometiendo la producción de semillas, especialmente en aquellas variantes que requieren vernalización, y 4) que la sequía mejora la productividad de las variantes de ciclo largo y bajo rendimiento.

Se ha propuesto que las plantas que escapan al estrés adelantando la floración presentan rendimientos de semillas bajos. Esto se confirma si se toma en cuenta que Bd1-1 y Tek10 escapan a la sequía y que son las de menor rendimiento, y que Bd21, en cuyo caso no hay escape, tiene los rendimientos más altos. Sin embargo, no hay que perder de vista que Bd21 tiene niveles de producción de semillas altos incluso en los tratamientos control ( $307,9 \pm 73,4$ ) donde la sequía no tendría influencia alguna, y que aunque Bd1-1 y Tek10 presenten rendimientos bajos ( $12 \pm 1,6$  y  $10 \pm 0,2$ ) y no se hayan tratado con vernalización, la exposición a la sequía podría tener implicación en el aumento en la producción de semillas en estas variantes.

En apoyo a esta hipótesis, un reporte reciente (Wang *et al.*, 2014) indica que cuando las plantas se exponen a estrés hídrico de baja intensidad antes de la floración, adquieren mejor capacidad para tolerar un estrés de mayor intensidad posterior a la floración, traduciéndose en un mayor

rendimiento de semillas. Este efecto es importante y puede ayudar a comprender por qué las variantes Bd1-1 y Tek10 en estrés por sequía 2 y 3 presentaron mayores rendimientos de semillas que sus controles respectivos. Es probable que la estrategia de escape que presentaron estas variantes también haya sido un factor para el aumento de la productividad, aunque aún se requieren más experimentos para aseverarlo.

### **8.7 Expresión de *GIGANTEA* y *SOC1* en *B. distachyon* bajo estrés por sequía**

La floración en las plantas está regulada por una red compleja de factores genéticos que se activa por combinación de estímulos endógenos y exógenos. Existen 5 rutas de floración que están conectadas a través de genes y proteínas integradoras, muchos de los cuales se regulan de acuerdo al reloj circadiano. Ejemplos de éstos son *CONSTANS*, *FT* y *GIGANTEA*.

Aunque las rutas de floración se han descrito implicando estímulos como el fotoperiodo, la temperatura y las hormonas, aún no se ha identificado con detalle la ruta ni los elementos moleculares que participan en la respuesta de escape a la sequía. Recientemente se reportó en *Arabidopsis* la participación del gen *GIGANTEA* (*GI*) en la respuesta de escape a la sequía (Riboni *et al.*, 2013). *GI* es un gen que funciona río arriba en las rutas de floración (Fig. 2). *GI* activa a los florígenos *FT* y *TWIN SISTER OF FT* (*FTL*) vía activación de *CONSTANS* (*CO*). Se sabe que *GI* también puede activar a *FT* en forma independiente de *CO*, mediante la regulación del microRNA miR172. En fotoperiodo de días largos, la activación de los florígenos llevan a la inducción de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*), para desencadenar la floración en el meristemo (Fig. 2).

En este trabajo se analizó la expresión de los genes *GI* y *SOC1* en *B. distachyon* Bd21 bajo fotoperiodo largo y regular, en condición control y de sequía. De acuerdo a resultados de PCR cuantitativa, se observó que la expresión de ambos transcritos sigue ritmo circadiano similar en todas las condiciones. En el caso de *GI*, alcanza picos máximos de acumulación 4 horas previas al fin de la fase de luz y disminuye a niveles basales durante el periodo de oscuridad (Fig. 27), en concordancia con lo reportado previamente en la cebada y en *B. distachyon* (Dunford *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2010). Sin embargo, es notorio que los niveles de expresión de *GI* son significativamente superiores en los tratamientos de sequía, independientemente del fotoperiodo empleado.

Contrario a lo que se esperaría, la acumulación de *GI* en las plantas bajo estrés no implicó el escape a la sequía en Bd21. Esta variante no adelanta la floración en ninguno de los fotoperiodos probados, aunque en ambos se acumula *GI*. Esto sugiere que *GI* podría estar involucrado en otras rutas de respuesta a sequía, que no necesariamente culminan con la inducción de la floración. Dado que *GI* es un factor que funciona río arriba de *FT* y de *SOC1*, es probable que deban existir otros factores reguladores que conecten la acumulación de *GI* con la respuesta de escape. Además, con las evidencias previas que muestran la versatilidad de *GI*, al inducir a *FT* vía *CO*, o vía miR172-independiente de *CO*, es probable que pueda activar otras rutas y mecanismos que no necesariamente culminen con la inducción temprana de la floración en la respuesta a sequía.

Con relación a *SOC1*, se notó una tendencia a presentar niveles de expresión más bajos en plantas tratadas con sequía que en plantas control (Fig. 27). Esto concuerda con el retraso en la floración que se observa en Bd21 bajo tratamiento de sequía. El perfil de expresión de *SOC1* no mostró regulación rítmica clara en los diferentes tratamientos ni en los fotoperiodos. Si bien, en varios puntos la expresión no presentó diferencias significativas entre tratamiento de estrés y control, se observó que en el punto del día donde la expresión alcanzó un nivel máximo en el tratamiento control (20ZT, fotoperiodo regular) las plantas en tratamiento de sequía no registraron aumentos (Fig. 28 c,d). Esto concuerda con el retraso en la floración que se observa en Bd21 bajo tratamiento de sequía. En el fotoperiodo largo, en general, *SOC1* se expresó siempre a niveles inferiores en el tratamiento de sequía (Fig. 27). Es probable que debido a que estas pruebas se realizaron con tejido aéreo completo, no se hayan logrado detectar diferencias finas de expresión específica en meristemas, que son el sitio de activación de *SOC1*.

## IX. CONCLUSIONES

- ❖ En los tratamientos de luz, se observó que la luz alta de  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  favorece el crecimiento de todas las variantes de *B. distachyon*, produciendo gran número de hojas y ramificaciones. Estos parámetros experimentan reducciones en intensidades de luz inferiores.
- ❖ Se confirmó la amplia variación natural en la duración de las etapas de desarrollo y el tiempo a floración que existe entre variantes de *B. distachyon* y fue posible usarla para estudiar el efecto de la sequía en la floración.
- ❖ Los diferentes tratamientos de sequía redujeron el número de hojas, inflorescencias y altura de la planta, en todas las variantes, en función de la intensidad del estrés.
- ❖ En lo que respecta al tiempo a floración, las variantes Bd1-1, Bd2-3 y Tek10 presentaron una respuesta clara de escape a la sequía, mientras que Bd21 retrasó la floración. Esto demuestra que en *B. distachyon* es posible encontrar mecanismos de respuesta contrastantes.
- ❖ El análisis molecular de Bd21 mostró que *GI* es inducida hacia el final del día, durante el fotoperiodo de días largos o regulares. En el estrés por sequía grave (S3), las plantas muestran una fuerte acumulación de transcritos de *GI* en comparación con los mantenidos en tratamientos de riego normales.
- ❖ El análisis molecular mostró que *SOC1* no muestra acumulación diferencial en respuesta al estrés por sequía, consistente con el patrón de floración tardía en Bd21. Esto sugiere que la inducción de *GI* en respuesta al estrés en *B. distachyon* no está conectada con la expresión de *SOC1* y que por lo tanto *GI* podría actuar en una ruta independiente de respuesta al estrés, que no necesariamente implica la inducción de la respuesta de escape.

## X. PERSPECTIVAS

1. En el presente trabajo las plantas de floración tardía (Tek10) que se mantuvieron en estrés severo (S3) tuvieron un efecto de producción de semillas más eficiente que las plantas Bd21. Se podría investigar a nivel transcriptómico los eventos moleculares implicados en este fenómeno.
2. Es recomendable la caracterización fisiológica del tiempo a floración con un fotoperiodo de luz regular (16h/luz y 8h/oscuridad) en las 4 variantes, con los tres niveles de sequía para observar si la respuesta al estrés es similar con el fotoperiodo largo.
3. Durante esta investigación se realizaron experimentos con diferentes intensidades de sequía (60, 40 y 30%) y el control hasta llegar a la etapa de floración. Se propone realizar pruebas de germinación en todas las variantes para observar la viabilidad de las semillas que se obtuvieron en el estrés severo (S3).
4. En el futuro, se podría extender el análisis de expresión de los genes (*SOCl* y *GI*, incluyendo a *FT* y *CO*) en las variantes de ciclo de vida largo, en diferentes órganos de la planta (tallo, hojas y meristemas) bajo los tratamientos control y de estrés severo (S3), durante diferentes etapas de desarrollo de *B. distachyon*, para comprender su implicación en la plasticidad del tiempo a floración.
5. Ampliar el estudio para dilucidar la relación entre la acumulación de biomasa, la producción de semillas, la administración del agua y la tolerancia en condiciones de sequía en *Brachypodium*.



## XI. REFERENCIAS

1. Agroasemex (2006) La experiencia mexicana en el desarrollo y operación de seguros paramétricos aplicados a la agricultura. Agroasemex. <http://www.agroasemex.gob.mx>, pp. 42.
2. Amasino RM, Michaels SD (2010) The timing of flowering. *Plant Physiology* 154: 516-520.
3. ASERCA (2013) MASAGRO por la seguridad alimentaria y el desarrollo agrícola sustentable de México. *Claridades Agropecuarias*, 237.
4. Barrera-Figueroa BE, Peña-Castro JM, Acosta-Gallegos JA, Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B (2007) Isolation of dehydration-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 late embryogenesis abundant mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars. *Functional Plant Biology* 34(4) 368–381.
5. Barrs C, Weatheley PE (1968) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Science* 15, 413-428.
6. Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit Reviews in Plant Science* 24: 23–58.
7. Bernier G, Périlleux C (2006) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* 3: 3-16.
8. Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.
9. Bidinger FR, Hash CT (2004) En: *Physiology and Biotechnology Integration for Plant Breeding*. Editado por Henry T. Nguyen y Abraham Blum. Ed. Marcel Dekker, Inc.
10. Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-447.
11. Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, Mare` C, Tondelli A, Stanca AM (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* 105, 1–14.
12. Cerdán PD, Chory J (2003) Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423: 881-885.
13. CONAGUA (2012) Reporte del clima en México. Reporte annual 2011. <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/analisis/reportes/Anual2011.pdf>
14. Cutler RE, Blair AD, Burgess ED, Parks D (1982). Pharmacokinetics of ceftizoxime. *J Antimicrob Chemother* 10 (Suppl C): 91
15. Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge APM (2001) *Brachypodium distachyon*: a new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 127: 1539–1555.
16. Dunford RP, Griffiths S, Christodoulou V, Laurie DA (2005) Characterisation of a barley (*Hordeum vulgare*) homologue of the Arabidopsis flowering time regulator GIGANTEA. *Theoretical Applied Genetics* 110(5): 925-931.
17. El Economista (2012) <http://eleconomista.com.mx/finanzaspublicas/2012/02/09/sequia-propicia-grandes-perdidas>
18. FAO (2009) How to feed the World in 2050? Resumen ejecutivo. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Fee](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Fee)
19. Folger T (2014) The next Green Revolution. <http://www.nationalgeographic.com/foodfeatures/green-revolution/>

20. Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA, Coupland G (2009) Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell* 17(1): 75-86.
21. Franks SJ (2011) Plasticity and evolution of drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*. *New Phytologist* 190:249-257.
22. Gibson AC (1996) Structure-Function Relations of Warm Desert Plants. Adaptations of desert organisms. Springer-Verlag Berlin.
23. Goldberg RB, De Paiva G, Yadegari R (1994) Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* 266: 605-614.
24. Gregis V, Andrés F, Sessa A, Guerra RF, Simonini S, Mateos JL, Torti S, Zambelli F, Prazzoli GM, Bjerkan KN, Grini PE, Pavesi G, Colombo L, Coupland G, Kate MM (2013) Identification of pathways directly regulated by short vegetative phase during vegetative and reproductive development in Arabidopsis. *Genome Biology* 14:R56.
25. Gutiérrez-Bonilla LA, Montfort GF, López FE (2006) Impacto económico en el sector agrícola. En: Inundaciones 2005 en el estado de Veracruz. Eds. Tejada MA, Welsh RC. Universidad Veracruzana p. 135-158.
26. Harb A, Krishnan A, Ambavaran MMR, Pereira A (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154(3): 1254-1271.
27. He Y, Amasino RM (2002) Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends in Plant Science* 297(5579): 243-246.
28. Hong SY, Lee S, Seo PJ, Yang MS, Park CM (2010) Identification and molecular characterization of a *Brachypodium distachyon* GIGANTEA gene: functional conservation in monocot and dicot plants. *Plant Molecular Biology* 72: 485-497.
29. 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.
30. Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF (2011) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol. Biol. Rep.* 39(2):969-87.
31. Huang T, Böhlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O (2005) The mRNA of the Arabidopsis gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309: 1694–1696.
32. IBI (2010) International *Brachypodium* Initiative (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763-768.
33. Izawa T, Shimamoto K (1996) Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. *Trends in Plant Science* 1(3): 95-99.
34. Khan MR, Ai XY, Zhang JZ (2014) Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wire rna* 5(3): 347-359.
35. Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Soppe W (1998) Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 345-370.
36. Kramer, P.J. (1983) Water relations of plans, New York: academic press. San Diego, pp. 89–101.
37. Kumar S, Yalaw AW (2012) Economic impacts of climate change on secondary activities: A literature review. *Low Carbon Economy* 3: 39-48.
38. Lee J, Lee I (2010) Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* 61(9): 2247-2254.
39. Liftchitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Álvarez JP, Eshed Y (2006) The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *PNAS* 103(16): 6893-6403.
40. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2–DDCT method. *Methods* 25: 402–408

41. Luo N, Liu J, Yu X, Jiang Y (2011) Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 141: 19-29.
42. Lv B, Nitcher R, Han X, Wang S, Ni F, Li K, Pearce S, Wu J, Dubcowsky J, Fu D (2014). Characterization of FLOWERING LOCUS T1 (*FT1*) gene in *Brachypodium* and wheat. *PLoS One*. 9(4):e94171.
43. Matesanz S, Gianoli E, Valladares F (2010) Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of The New York Academy of Sciences* 1206: 35-55.
44. McClung CR (2006) Plant circadian rhythms. *The Plant Cell* 18:792-803.
45. Meier U (2001) Growth stages of mono-and dicotyledonous plants. *BBCB Monograph*. 2a. Ed. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry.
46. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682.
47. Mockler T, Yang H, Yu XH, Parikh D, Cheng Y, Dolan S, Lin C (2003) Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *PNAS* 11(4): 2140-2145.
48. Moon J, Sun SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I (2003) The SOC MADS-box genes integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J*. 35: 613-623.
49. Morris K, Thornber S, Codrai L, Richardson C, Craig A, Sadanandom A, Thomas B, Jackson S (2010) DAY NEUTRAL FLOWERING represses CONSTANS to prevent *Arabidopsis* flowering early in short days. *The Plant Cell* 22: 1118-1128
50. Nilsen ET, Orcutt DM (1996) *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley and Sons, New York, NY.
51. Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH (2008) *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends Plant Sci*. 13: 172-177.
52. Peña-Castro JM (2014) La respuesta molecular de las plantas ante el estrés por inundación: lecciones aprendidas del gen SUB1A. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 325-337.
54. Ream TS, Woods DP, Schwartz CJ, Sanabria CP, Mahoy JA, Walters EM, Kaeppeler HF, Amasino RM (2014) Interaction of photoperiod and vernalization determines flowering time of *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiology* 164: 694-709.
55. Riboni M, Galbiati M, Tonelli C, Conti L (2013) *GIGANTEA* enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*. *Plant Physiology* 162: 1706-1719.
56. Saldaña-Zorrilla SO (2007) Socioeconomic vulnerability to natural disasters in Mexico: rural poor, trade and public response. *Comisión Económica para América Latina y el Caribe*. United Nations Publication. 64 pp.
57. 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 Resources* 3: 38-46.
58. Schmalenbach I, Zhang L, Reymond M, Jiménez-Gómez JL(2014) The relationship between flowering time and growth responses to drought in the *Arabidopsis Landsberg erecta* x Antwerp-1 population. *Frontiers in Plant Science* 5, Art. 609.
59. 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 Resources* 3:38-46.
60. Shrikanth A, Schmid M (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2013-2037.
61. Sinha (2004) *Modern Plant Physiology*. Alpha Science International Ltd. pp.556.
62. Skirycz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S, Pucci1 A, Gonzalez N, Hoerberichts F, Tognetti1 VB, Galbiati M, Tonelli C, Van Breusegem F, Vuylsteke M, Inzé1 D (2011) Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology* 3: 212-214.

63. Sun TP (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Current Biology* 21: R338-R345
65. Taiz L, Zeiger E (1998) *Plant Physiology*. Second Edition. Ed. Sinauer Associates, Inc. USA. pp. 792.
66. Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316:1033-1036.
67. Tan FC, Swain SM (2006) Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. *Physiologia Plantarum* 128: 8-17.
68. Tyler L, Fangel JU, Fagerström AD, Steinwand MA, Raab TK, Willats WGT, Vogel JP (2014) Selection and phenotypic characterization of a core collection of *Brachypodium distachyon* inbred lines. *BMC Plant Biology* 14:25.
69. Vogel J, Hill T (2008) High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* 27: 471–478.
70. Vogel JP, Garvin DF, Leong OM, Hayden DM (2006) Agrobacterium-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85: 199–211.
71. Vogel JP, Gu YQ, Twigg P, Lazo GR, Laudencia-Chingcuanco D, Hayden DM, Donze TJ, Vivian LA, Stamova B, Coleman-Derr D (2006) EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theoretical Applied Genetics* 113:186-195.
72. Wada KC, Takeno K (2010) Stress-induced flowering. *Plant Signaling and Behavior*. 5: 914-917.
73. Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M, Schmid M (2013) Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 339(6120): 704-7.
74. Wang S, Bai Y, Shen C, Wu Y, Zhang S, Jiang D, Guilfoyle TJ, Chen M, Qi Y. (2010) Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor*. *Funct. Integr. Genomics*, 10:533-546.
75. Wang X, Vignjevic M, Jiang D, Jacobsen S, Wollenweber B (2014) Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. *Journal of Experimental Botany*, 65(22): 6441–6456.
76. Wellmer F, Riechmann JL (2010) Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends in Genetics* 26 (12):519-527.
77. Werner JD, Borevitz JO, Uhlenhaut NH, Ecker JR, Chory J, Weigel D (2005) FRIGIDA-Independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *Genetics* 170: 1197-1207.
78. Winter K, García M, Holtum JAM (2008) On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1829-1840.
79. Wu CA, Lowry DB, Nutter LI, Willis JH (2010) Natural variation of drought-response traits in the *Mimulus guttatus* species complex. *Oecología* 162:23-33.
80. Xu JL, Lafitte HR, Gao YM, Fu BY, Torres R, Li ZK (2005) QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theoretical Applied Genetics* 111(8): 1642-1650.
81. Yamaguchi A, Abe M (2012) Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *Journal of Plant Research* 125: 693-704.
82. Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D (2009) The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL and APETALA1. *Developmental Cell* 17(2): 268-278.
83. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217(4566):1214-22.

84. Yancey, P. H. 1994. Compatible and counteracting solutes. In K. Strange (ed.), Cellular and molecular physiology of cell volume regulation, pp. 81–109. CRC Press, Boca Raton
85. Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38(1): 171-186.
86. Zeevaart, J.A.D. (1976). Physiology of Flower formation. *Annual Review of Plant Physiology* 27, 321-348.
87. Zhang D, Moran RE, Stack LB (2004) Effect of phosphorus fertilization on growth and flowering of *Scaevola aemula* R.Br. "New wonder". *Horticulture Sciences* 39(7): 1728-1731

## APÉNDICE A

### Preparación de las soluciones empleadas en este trabajo

#### 1.- Agarosa para DNA y RNA 1%.

Componentes	Volumen (100 ml)
Para DNA	
Agarosa (grado analítico)	1 g
TBE 1X, c.b.p.	100 ml
Bromuro etidio	4-6 µl

#### Modo de preparación:

- ❖ Disolver la agarosa en el TBE calentando en el horno de microondas durante 20 s, hasta que se disuelva perfectamente bien sin burbujas y sin grumos.

Componentes	Volumen (100 ml)
Para RNA	
Agarosa	1 g
H <sub>2</sub> O-DEPC	72 ml
MOPS 10 X 3-(N-Morpholino) propanesulfuric acid. O también conocido como 4-Morpholinepropanesulfuric acid.	10 ml
Formaldehido (36.5-38%)	18 ml

#### Modo de preparación:

- ❖ Disolver la agarosa en 72 ml de agua de DEPC.
- ❖ Dejar enfriar un poco y cuando ya no esté muy caliente agregar el MOPS y el formaldehído.
- ❖ Mezclar y guardar a temperatura ambiente.

Nota: No adicionar el formaldehido cuando la agarosa esté muy caliente.

#### 2.- Agua DEPC

Componentes	Volumen (1000 mL)
Dietil pirocarbonato	1 mL
Agua desionizada	1000 mL

**Modo de preparación:**

- ❖ Agregar el volumen de DEPC al agua desionizada y mantener en agitación de 12 a 24 h. Esterilizar a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 min. Mantener a temperatura ambiente.

**3.- Amortiguador TAE 10X**

Componentes	Volumen (1000 mL)
TRIS base	48.5 g
Ácido acético glacial	11.4 mL
EDTA (0.5 M)	20 ml
Agua desionizada, c.b.p.	1000 mL

**Modo de preparación:**

Disolver el TRIS, ácido acético y EDTA en 800 mL de agua. Aforar a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente. Para preparar 1 litro de TAE 1X agregar 100 mL de TAE 10X y 900 mL de agua desionizada.

**4.- Amortiguador TBE 10X**

Componentes	Volumen (1000 mL)
TRIS base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA (0.5 M)	40 mL
Agua desionizada c.b.p.	1000 mL

**Modo de preparación:**

Para preparar un litro de amortiguador, diluir TRIS base en ~800 mL de agua desionizada. Agregar el ácido bórico y mezclar hasta disolver completamente. Agregar EDTA y aforar a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

**5.- Buffer de carga para RNA 5X**

Componente	Volumen (10 mL)
Formamida	3084 µL
Formaldehído	720 µL
MOPS 10X	4 mL
EDTA (0.5 M)	80 µL
Azul de bromofenol	16 µL

<b>Bromuro de etidio</b>	10 mg
<b>Glicerol</b>	2 mL
<b>Agua DEPC</b>	10 mL

**Modo de preparación**

- ❖ Agregar en un tubo cónico con tapa cada uno de los componentes y mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas. Almacenar a 4 °C.

**6.- Amortiguador de MOPS 10**

<b>Componentes</b>	
<b>Acetato de sodio</b>	5.44 g
<b>MOPS</b>	20.60 g
<b>EDTA (Stock 0.5 M) pH 8.0</b>	10 ml
<b>NaOH (Stock 2N)</b>	Utilizar NaOH hasta llevar a un pH 7.0
<b>H<sub>2</sub>O- DEPC c.b.p.</b>	500 mL

**Modo de preparación:**

- ❖ Disolver el acetato de sodio en 370 ml de agua de DEPC.
- ❖ Adicionar el MOPS y disolver.
- ❖ Agregar el EDTA (10 ml)
- ❖ Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 2 N.
- ❖ Aforar a 500 ml con agua DEPC.

**7.- EDTA 0.5 M, pH 8.0**

<b>Componentes</b>	
<b>EDTA</b>	9.305 g
<b>NaOH</b>	Agregar hasta llevar pH 8
<b>Agua Desionizada c.b.p.</b>	50 ml

**Modo de preparación:**

- ❖ Adicionar el EDTA a 40 ml de agua.
- ❖ Ajustar el pH a 8.0 con un NaOH para que el EDTA se disuelva totalmente.
- ❖ Aforar a 50 ml con agua desionizada.



- ❖ Nota: Si el EDTA es para trabajar con RNA, usar agua desionizada tratada con DEPC.

#### **8.- NaOH 2 N**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (100 mL)</b>
<b>NaOH</b>	8 g
<b>Agua desionizada</b>	100 mL

#### **Modo de preparación:**

- ❖ Agregar 8 g de NaOH a 100 mL de agua desionizada en un frasco y mezclar hasta disolver. Almacenar a temperatura ambiente.

## APÉNDICE B

### Extracción de RNA (TRIzol)

#### Fase de separación

Nota: partiendo de una muestra amacerada de la planta de 500 µg agregar lo siguiente:

- 1.- Agregar 1000 µL de TRIzol a cada tubo, homogenizar en un vórtex durante 15 s y dejar reposar durante 5-20 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Transcurrido ese tiempo agregar 200 µL de cloroformo y homogenizar la muestra 15 s.
- 3.- Dejar reposar la muestra durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Centrifugar la muestra a 13 000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- 5.- Pasar el sobrenadante (fase superior) a tubos nuevos y volver a repetir todo desde el paso número 2.

#### Proceso de aislamiento del RNA

##### Precipitación de RNA

- 1.- Agregar 1000 µL de isopropanol a la fase acuosa y homogenizar en el vórtex durante 10 s a temperatura ambiente.
- 2.- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Centrifugar a 13 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
- 4.- Retirar el sobrenadante y dejar la pastilla proceder a realizar el lavado.

##### Lavado de RNA

Nota: Mantener la muestra siempre en hielo.

- 1.- Lavar la pastilla con 1000 µL de etanol al 70%. Nota: se puede guardar a -20 °C en dado que caso que no se ocupe en ese mismo momento esta puede durar hasta un año y si se guarda a 4°C dura solo una semana.
- 2.- Homogenizar durante 5 segundos muy bien hasta que la pastilla se despegue completamente.
- 3.- Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Tirar el sobrenadante.
- 4.- Volver a lavar de nuevo con alcohol etílico al 70%.
- 4.- Retirar el alcohol y dejar secar la pastilla durante 5 – 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Agregar 20 µL Agua DEPC.
- 6.- Realizar una lectura en el nanodrop.

## APÉNDICE C

### Diseño de Oligonucleótidos para amplificar el gen *SOC1*

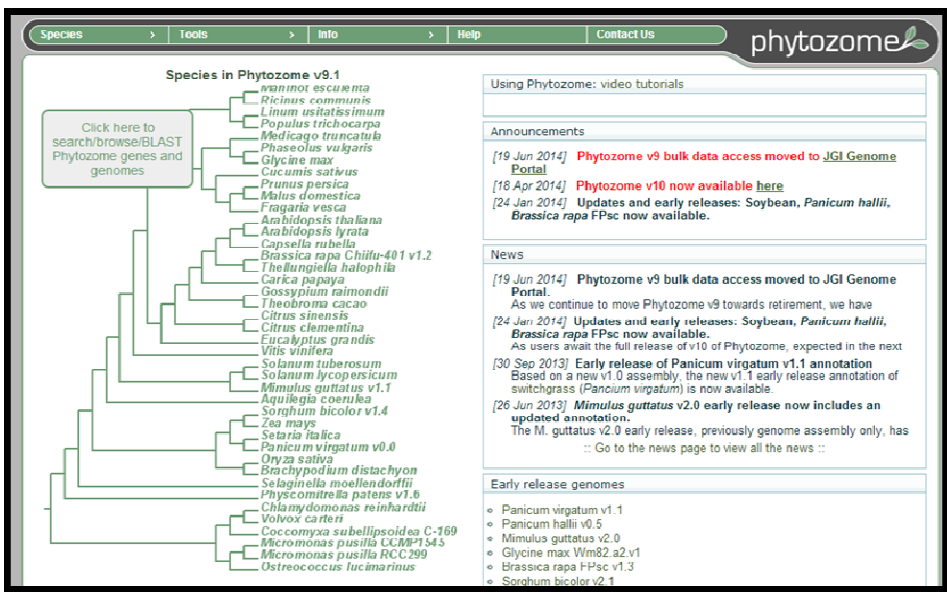
Los oligonucleótidos empleados en este trabajo para la amplificación del gen *SOC1* de *B. distachyon* se diseñaron de acuerdo a los siguientes criterios:

- I – Cada oligonucleótido individual debía contar con una longitud de 18-24 bases.
- II – Se mantuvo un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60 %.
- III – Los dos oligonucleótidos del par debían tener temperatura de melting “Tm” cercanos, dentro de los 60 °C.
- IV – La secuencia de los oligonucleótidos individuales inició y terminó con 1 o 2 bases púricas.
- V – Se evitaron regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias inteRNAs.
- VI – Se evitaron secuencias poli X.
- VII- Se evitó la formación de dímeros entre ellos.
- VIII- Se trató de tomar un primer en un exón y el otro primer en el siguiente exón de la secuencia del gen. De tal forma que se pudiera detectar la presencia de DNA genómico por la amplificación de un producto que incluye al intrón.

#### Pasos para la realización de Oligos

Para diseñar y analizar el par de oligos para ser usados en una reacción de PCR contamos con varios programas.

Paso 1.- Lo primero que se realizó es encontrar el ID del gen analizar y bajar la secuencia. Esto se realizó por medio de la página <http://www.phytozome.net/> :



The image shows the Phytozome v9.1 website interface. On the left, a phylogenetic tree displays various plant species, with *Brachypodium distachyon* highlighted. A box above the tree says "Click here to search/browse/BLAST Phytozome genes and genomes". The right sidebar contains sections for "Using Phytozome: video tutorials", "Announcements" (with dates and links for v9 bulk data access and v10 availability), "News" (with dates and links for v9 bulk data access and v10 assembly), and "Early release genomes" (listing *Panicum virgatum*, *Panicum hallii*, *Mimulus guttatus*, *Glycine max*, *Brassica rapa*, and *Sorghum bicolor*).

Página de inicio de Phytozome.

En la página se seleccionó a la especie en estudio y mediante la herramienta Genome Browser, se buscó el gen de interés: Bradi1g77020.

Enseguida se muestra la secuencia genómica de *SOC1*. Para fines ilustrativos, se presenta la secuencia completa del gen. En letras grandes se encuentran las regiones del gen relevantes que se eligieron para el diseño de los oligonucleótidos, en letras pequeñas el resto. En verde se resalta la región 5'UTR y el promotor parcial. En azul se muestran los exones y en texto sin resaltar los intrones. Los oligonucleótidos se resaltan en color rosa fuerte. Finalmente la región 3'UTR se observa en rosa claro.

### Secuencia del gen *SOC1* (8516 b)

>Bradi1g77020

```
GGGGTGGGGTGCCTGGGTGGGCAAAGAAGGAAGGAGCGGCTACGGCCGAGAGAGAGCGCCCTACAGCACCAGGATCTCCCTCTTCCCCCCCTTGCCATTTTTTAT
GAGTCTCCCTTTGCCGCTCCGGAGAGATAGATCCCGTCTTCTTCTTCCCTTCCCTCGCGTTTCCACTTTTTCGCTTGGCCGCGCCGCCAAATGGATAAGACT
TGCTACTGACTCCTCCTCCCTTTCTGTTTCCCTCACCCGTGGTGTGTTCTTGGTTGGATGCAGGCAGGCCGGCTCGATCGGAGAGGATCTATTTGGGATCGGTCG
ACGAAGATGGTCCGGGGGAAGACGCGAGCTGAAGCGGATGAGAACCAGGCGAGCGGCAGGTGACCTTCTCCAAGCGCCGCGCGGCTGCCAAGAAGGCGCAC
GAGCTCTCCGTCCTCTGCGATGTTGAGGTCCGCTCATCGTCTTCTCCCCAGCGGCGGCTCTACGAGTTCGCCAGCGCCAGTAAAAAACCATCTCTCATC
TCCTGCTTTACTTAATCTCATAAATTGCTCTTTGTCTTTCTTACTATCTTTTGTCTTGTCTGTCTGGTGGGGGAATGCGGGTGGGGGCTAGCTTGGGGCTGGGAA
TCCAAATTTGTTTACAGAAAAGAACGCTGCGAATCTGATGGATCTTGGCGTGCACCCGTAGCTGCTTGCGCCAACTCCTGTGCCCGTGGCTGCCAATGAGGG
GAAAGAAGCTCTCTGTAGTGTAGTACTGTGGAGATGCCCTTCTCTACCTTCGCCCATCCACTTGGCTGATTTTTTTTCAAGTTTTCCACATCCATA
TCTCTTCGAGAATCTGCCTCGCTTCTTGGCATGCACTTGCAGTAGTACCATTATGATTTTCTACTATTTCTCGCTACTGGTATTGCTACCATTTGGGCTAA
ACTTCAAAGCTGTCTCAGCCTTAGTACATGTAGGCAACTCATAGCTCTATTGGCCTAGTCATTTTTAATTAAAGACCTAGCCAAATAGGAAAAGACGGCAAAA
AAGGAAATTTTTTACTCCTGGTAGCCAGAAATGTTTAGCGCACACACTAAACGCTTGTCTGAATATTGTTTGCCTTGTGTTGGTGGCTGGCTGTTTCATCTGT
GCATTAATTTGCTGTCTGAAATGGAATCGATGCAATGCGATATGGTGTCCATGTTGTACTACTTATCAACTGTAGAGAGAGTACCTTTTTTACTGTAAACATG
CTCCACCGGTATATTTAGTTGTGCATTTGCTGTACTAAGTTTATAGTCTACTACATCTCCTACGGAATAGTAATTAATTAACCTAATATTTCCCTCAGATTA
TAAAAAATAGAAATCAGATTTGAAATTCGTAGAAATGAGCTTTACAGGACTAGAAGCGTCATTAGATTTTCTGGGCAGTGTACTGTGAACCTGCTGTGGTCT
TGTACGTACAAATAGATTCGACAGCAGAACTAATTAGGTTGCCAAGCAAGTTCCTCAATATTGTTCCGATTTTAAATATGACGCCCTTTTTTGGAGAAATGA
AATAAAAGGATGATTTCCAATATTTTATTAGCTGACATTTTGTGGTCATGCATATATTTGTCTATCGGTGAGGATATATGTTTCAAAGTATATGATACAGT
TGTATTCAATGCATGATCCGGCCACACCCAGCCAAAATATCATTAGATAAGTCAAGACCATGGTCAATATAGGGTGACAGTTGAATATCAGATTAATATTC
AGATTTTGCAATGTCGCAACAGAGTCCGGCACAACCAACTGCTATCTTAAATCACTACACAAAATATGACCTAATAAAGTGTGGACCAAGCATTGA
TTCTCATGGGTTAATCAATCACTTTTATGATCGGTTGATCAAAAACATAAAAAGAACATGATTTAGTTGTTCTGAGATGAGAGTTGGTGGGAGGAGAGAATA
ACCTGTATGCTGAATTAACAAGATTTTAGAGATAGACCTTGTAACTTAAATGGAGGGCGAGTTTGGATAGTTCACTTTAGTATATATCCTCAATATGAGC
ATGTTCTGGAATTTGCCACGTAATAAATTTGGCTATGCACGAAATGTTTATGTACAACATAGTGTAAAAATGATAATCTATAGTCTCGATTCAAAATATCAG
ATCAAAAAGCTAGTATATGTGTGTTGACTTCAAGCATGCAATAACAAAAGAAAATCCTTTCCCTTTTGCATGTAGGAAATAGAAAAGGTTTCTTGTTCGCA
TGAATATGTCACGAATCATGAGTAGATCTAATGCCAAGCGACAAAAGATATATATATAGGTGCATTTGTTTCTTATTTTGGTAGACAAAATTTGACATGAGG
AGAAAAACATATTTCTATTTTGTGCTAGATATATATATATATTAATGTTTCTATTTTTCATCCTGTTATTTCCATCTTGGATTAACACACACATGAGGGG
CTAATATGCATTTGGCTCTAGAGTGTATACGGACATCTCCCTCTCCCCCTAGTGGAGAGACTACACAACCATATTAATGGCCCAATTTCCCTACAAGTGGGCC
TCTTGGGGTAGTCTAATGTACACCTGCCACCAAAGGACCCCTGCCAGTTGACAATACCACCATGTGAGGCGATATAATAGGAGCTTACCCTCTTAGCAA
AGTTGATGATATAGTGTGGTACATGTTGTAACCTTGTAAATGCTGAGTTTGGCTTCAAATAAAATGGATATTTTCCGCTGGAAATCCACCTGACGAATGGGA
CCGAAACGAGAAGGTGAAGAAATATGACGTGGAAGAACTAAGGCAATCAACATGAAGCTCACATATTTTCAATGCCCATCAAGAAGTCCACAAAATCCAGAGCTT
GTCTGATTCACCCCTGGTTTGTATGGCTTCTGCTTGAACCTAGAAGGATATTAGTATTTGATTTCCATCTTAATTAATACCATGCAGAAATCATGAACCAAGA
CCCTACCAACCTCATGGATCAATTAGTACATACACCATAATTGGATTGGTTGTGCTTATGCTCAATACAAGGACAAGATGGGTCAAATTTGCTGGCTTTAGCTT
AATTAAGAAGGCCATGGGTGCTTGGAAACCAACATGCCTCTTGGAAATACACAGATCACATCTATCAAGGTGGGCCCTAAATCTTCTTAGTAGATCATGTAG
TCATTAAGAGGATTTTATGTTAAGCAAGAGAACGCTAATCTCAAGGAATATTGCTCGTTAGCATGGACCATATCATATGCTGGAATGAGGGAATCCACGCCCT
CTCAAACGATTTACACCTCATTCAATAACCCATACCAAAAATAGTTAAAAATATCATTGTCCAAACTGCAAGTCTACAATGATACATAACAAGGTCATTTCTATG
CTCCATGATTTACTATATTGTAAGTGTGAACTCAGTTGCATTAAGCACATTTGACTTAATTTGATAGTCAACATACCTTGTGGCTACTTATACCGAACCAATACA
CACACCACATGCTGTGTGCTTAAACCAAGTCCCTATAACCGTGAGGATCATGTGTCATGTTGGGCTTGAACAAGTGGATGTTCCATATATAGTGTCTTTGTCTG
ATCACCTAATGCTGAGGCTGAGGTTGATTTTGTATGTTTATATGTTTACTTCCCCCTTCTAGATATTGCTGTTTGTGTTTCAAGGAATATTGTTGCTTTG
TCACCTAACCTATGCCGATGGTTGATTTTGTATACACTTGTGTGCTTCCGCTTCCCAAAATAGGCTCGGCTTAGTCTTATTACACATAGCTATTCTCATGTACACC
GAGGGTCCCAATAAAAAAAGGATCCCTAAAAAATATTGGTCAAAAAATAAACTGATCAATGAGTGTGCTATCTTTAATGCGCTTGGTATGGTTCAAGTTGAA
GATGGTCCGAGCATATCTTTGGGAAGAAAATGGGTGCGATTGTGCAAGTTGCTCTAGTGCCTTTGATATCATTGCCCAGCGAGAAGATTTGTTAGATATGTTA
CTAACGCTATGCAAAATGGTTCATGGCTAGCAGTACAATGGATCTTCAATCAGAGGCCACATCATTGCAAGTTCACAGTGTACGAAATCAAAGATGATGACAA
ACTTAATTTGGTGTGGCTAGTGCCTATGCTTGTATCTTAGACTGGCTTGCACCTTCAAGTATGTTGGTTGATGTTACTTTGAGCGCATTTTCTGATTTGCT
TTTTGTTCTTTGAGCAATTACTGTAACATTTGCTCGCGTATGATGATTTGAAACAAAGCTCAGAGGTGGATACACATTTAGATATAGAGTTTTTGTAGTTAGCT
GCACTCTTATTAAGTACTAGCATCCGTAGCATGCGATTCTACCAGCTTAGGAGTCTTCTCTTGTGCGTTCACTGGTTCAGAGGCTGGAGATCAAGATGATG
GCTCTATAAAACGACCTAGTGGCTCTCGTTGAATTTGACGACGATTATATGCGCACAAAGACCTAGATTAGTAGATCCACTTTAGCTCTCATATCCTTGTAAACAT
CTTGTCTAATAACACAAGGCGAGGCTGTAGGGCTATTACCATACCTCAAAGCCCTGAAGGTAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGG
ATCTCCCATCGTGATCTTATCGAGCCATGCCCCCGCCCTCCCGCTCCCGCGCTAACTTATTTTCAACACGACCACTTGGTCACTCATGAGATCAACAATAAA
ATTTCATCATACACCAATGTTTAGGGAAGATCAGATGATATCTTAGTTAGTCAAAAGCTTATTTGGTGAAGTGCCTTCTAGCCCTTAAATGGGTTTCCATGAT
ATTGACAAGCAATCAAGGAATAACAATTTTCTACGGGTTTGTATGATTAGGCAATGTCACCAAGGATGAAAATATATGTTGGTGTGCCACCACCCTTGAATAAAA
AGAGAAAAATAAGACAACCTGGTTAAATTTAGATTTAATCTCTCTTGTCTAGTAATGATAATCGCTTCAAGATATGTTAGTACTCTAATAAGAGACGTGTTCC
GACGAAAAGGTTGCGAGAAGGATTAATGCTAAGTCCCAATCTTGTACCAAAAAGCCAAAACCAAAATATCACACAACAGATTTTATGAGCATGGAGCAATTTG
```

GAAGGTTTCAGATTAGGCTTTACATACATAAAAATCAAACAGTTCTGGAAAAAATCTATAGCAAATCTACAGGTTAGCATTGTTGGTTCAGACTTGACCAAAATGC  
 GTCCTCATGGCCTAGAAGCTGGACGAGAGGTTGGCCTGGAGGAATGGAATCTGGAGTTTGGAGCAGGGTTGGATTGTAAGTGCAGTTGACCGATTGGATTT  
 GAAGGTTTGA AAAAACCTAGAGGTGCAAATTTATCTAAAAGCTCCCGGTGACTAGGTTTGTAGGTCGTCTAAGCCTCCCTCCCCCAAGGCTGAAGCATC  
 CTAGATCCACAAAATCCCGCCACACTCATGTGCTATCACACCTTTGTCAAAGATTGAATCCTTTAGAGGAAGAATCAAATATGGGCCCTTGACATAGAACA  
 TTGCAACTCTATTTGACTTTCAGCACCTGTGGAAAAAATCTGTTATTTGTTTCTAAGAATACCTTTCAGTTTGTACTTCCGAAAACTGCACATTTAATAATA  
 TTTTGTGACAAAAGCGAACTCGTTGAATTTTCTTTTCTTTTTCAGGCACGACTATGTCAAAATGTTGTTGTTATGTAATTTTCCCTCTAAAAAATATTGTT  
 AGGGAATGTGTAGTTCTAGTTCTCTCTGCAATTCAAACTACACTTTGCAAGTCAATCTTGTGTTTCTGAAATTTAGCCTTGAACCTTTATCTATCTGATGAT  
 CTGATAAAATATATATTGAGTACTGTCAAATGTCTATCTGAAGTCTGAGCCTAGGAATAATCTACTATTTAATGGACTGATTAGATAATCTGAAATGACATCA  
 GGGTAGCCCTAGAACCTACTCTAGCAGTAGCAGTGAAGTCAAGCCAGACTGTTCTTGTGTAGAATTGCGCTCCTTCTTCTCAGTTTATGTTGTAGCTTATCCA  
 GCAGTTGGACAGGTTGTGCGGTGCTGCTGACCAGATGCTGCAGAATGCAAATAAAATATACAAGCTTGGTTCCACATGTAATATAAAGTCAAGAAAATGCGT  
 TAGTCAAGATGGACACTTTCACAACAGTCTATACTAGTCTCATGGTAATATTGATACCAATATCTGTTGCTAACCAGACTATGTTTCTGATATGATATAT  
 TTTGTCTATTTTCATTAGCAAGATAGATGGAATAAGGGAAAAACCTCACTGAGTTGCAGAAAGGTTCAATTTCTTCTATATATTTCTTCTACTTCTTCTCTATAT  
 TCATAACACTGGAAATATATGATGATGTTTGTCTTAAATGAACGAATCTAATTATTATGACATAATTTTACATTTTAAATCCAAATTCAGCATGCAGAAA  
 AACTAGAACGTTATAAGGCATCCACAAGGACAAAATAGCAGCCCAACGGCACAGCAAGACATAGAGGTAATTTGCTTGTATCAGGTTTATATATATTGT  
 TTCATTTGGCGATTTTTCGTTGCTTCATGAGCAGTTCCTGTCCATTCAGTGAATGTTAAGCTAATTAGCATGCATCGATAAGCCTTTTACTTTATACTAGGC  
 ATCTACTGAAATGCTAAAACCATCCTGGACTGTAGCACCAGGTTTCAAGTAAAGTACTACTCCGTACGTACATAGCTAGTAGAGTTAAATTAATGAATGAGTAAAT  
 AATAAGACCTTGAATGAAACCATATCTAGCAGTTATCGCATGTTGAGATATATATATAGTACCATGTGATTATTTAACGGGGCAATTCGACGGGTGCA  
 TGATCTGAATACAGAGATAAAAGCTGATGCTGAGGGCTTGTACAGAAAATGGAAGCTTTGAAGCCTACAGAAAGTAACCTATTTACGCTTGAATTTCTCACC  
 CCCAACCTTTCAGTTGCAAGAGAAATGCTATCCATGCACCTGCGAAAACTCAGTGGACACTCTCTGTTATTGATATGCAGGAAATTTTTGGGT  
 GAAAAGTTGGAAGACGACTGTTCTTTTGAAGAGCTGAATAGTCTGGAGGTCAAGATGGAAA  
 AGAGCCTTCGTAGCATCAGGAGAATGAAGGTTAGCTATTTGCCAACTTACTATAACATTTTA  
 TTTTGTGTTGCAAAAATGAATATATCTACACAAAGAAAGCTTACACAACTTTGTATGCTGTG  
 CTGCTTATCTTACATGCCAGACTCAGGTGTTTGAAGATCAGCTCGCTAAGCTGAGACAGAA  
 GTAACCTCACCATGCACCTTGTGTCTATCCCTCATAGAAACCTGAAACCACAGAGGCACCC  
 ACATCAGTTCCCTCACATTGTGCTGTTTCAATTTGTTTCTTACATCAACCGTCGATCGAGCAGG  
 AGATGACGTTGCGCAAGGAGAACGAAGATCTAAGGGGCAAGGTGACCAAAAGCAGCGAAAA  
 CGAAGATCTTCAGGCCAAGGTAATCTAAAGACAGTAAACTTCCAGCCCAATGAACGATGAAACTCTCCATCCAACTTGCATTTCTGAA  
 AACGTGCCACAGCCGATCTCATGTGATGCTCTTGTATGTGACATAAACCTGATTGGCCGCAATTGATTGACCGCTCGTTTCTGCTCTGACGTCGAAGGA  
 TGTGGTCGACCTTACGCTGGTGAACCTCTGCTCCCATGATCGCCCGCGCGCGCGGGGGAGGAGGAGGAGAAACCTTCTGAGGCTCAGCCGGAGCTGAACAA  
 GGACGCCATGGACGTGGAGACGGAGCTGTTTATCGGACTGCCCGGACAGAAATCGCTCTGAATCTTGACTCGGCTGGATGCGAATGCGATCAGTCAGATGCAACA  
 CCGAACAGCAGATAGAAGATAGAACCCTCAACCACTTAATCTCTCTGTTACTGCCCGGAAATCCGAATCTGAGATCTGAAGTTATACATACATGTGT  
 TGACTGTGTTGCTGCTTGTGTCGATCC

La secuencia transcrita consta de 1221 nucleótidos. Las regiones se señalan en la misma forma que se especificó para la secuencia genómica.

**Secuencia del transcrito *Soc1* (1221 b)**

>Bradi1g77020.1

GGGGTGGGGTGCCCTGGGTGGGCAAGAAGGAAGGAGCGGCTACGGCCGAGAGAGAGCGCCCTACAGCACCAGGATCTCCCTCTTCCC  
 CCCCTTGCCATTTTTATGAGTCTCCCTTTGCCGTCTGGAGAGATAGATCCCGTCTTCTTCTTCCCTTCCCTCGCGTTTCCACTTT  
 TTCGCCTTGCCCGCGCCGCCAATTGGATAAGACTTGCTACTGACTTCTCTCCCTTTCTGTTTCCCTCACCCGTTGGTGTGTTCTI  
 GGTGGATGCAGGACGGCCGGCTCGATCGGAGAGGATCTATTTGGGATCGGTTCAGCAAGATGGTGGGGGGAAGACGAGCTGAAG  
 CGGATTGAGAACCAGGCGAGCCGGCAGGTGACCTTCTCAAGCGCCGGCGGGCTGCGCAAGAAGGCGCAGGACTCTCCGTCCTC  
 TGGCATGTTGAGGTCGCCCTCATGCTCTTCTCCCGACGGCCGCTCTACGAGTTGCGCAGCGCCAGCATGCAGAAAACACTAGAA  
 CGTTATAAGGCATCCACAAGGACAAAATAGCAGCCCAACGGCACAGCAAGACATAGAGAAGATAAAAGCTGATGCTGAGGGCTTG  
 TCACAGAACTGGAAGCTCTTGAAGCCTACAGAAGGAAATTTTTGGGTGAAAAGTTGGAAGACGACTGTT  
 CTTTTGAAGAGCTGAATAGTCTGGAGGTCAAGATGGAAAAGAGCCTTCGTAGCATCAG  
 GAGAATGAAGACTCAGGTGTTTGAAGATCAGCTCGCTAAGCTGAGACAGAAGGAGATG  
 ACGTTGCGCAAGGAGAACGAAGATCTAAGGGGCAAGGTGACCAAAAGCAGCGAAAAACG  
 AAGATCTTCAGGCCAAGTGAAGGATGTGGTGCACCTTACGCTGGTGCACCTCTGCTCCCATGATCGCCGGCGGGCGGCG  
 GGCGGAGGAGGAGGAGGAAACCTCCTGAGGCTCAGCCGGAGCTGAACAAGGACGCCATGGACGTGGAGACGGAGCTGTTTATCGG  
 ACTGCCCGGACAAAATCGCTCTTGAATCTTGACTCGGCTGGATGCGAATGCGATCAGTCAGATGCAACACCGAACAGCAGATAGAAG  
 ATAGAAACCCCAACCACTTAATCTCTCTGTTACTGCCCGGAAATCCGAATCTGAGATCTGAAGTTATACATACATGTGT  
 TGACTGTGTTGCTGCTTGTGTCGATCC

La secuencia de los oligonucleótidos seleccionados quedó como sigue:

Primer directo:

GAGCCTTCGTAGCATCAGGAGAAT

Primer reverso:

CTGAAGATCTTCGTTTTTCGCTGCC

Ya identificado el par de oligonucleótidos, se procedió a verificar sus parámetros en la página <https://www.idtDNA.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Página de inicio de IDT (Integrated DNA technologies)

Resultados del análisis de los oligonucleótidos:

Directo:

SEQUENCE: 5'- GAG CCT TCG TAG CAT CAG GAG AAT -3'

COMPLEMENT: 5'- ATT CTC CTG ATG CTA CGA AGG CTC -3'

LENGTH: 24

GC CONTENT: 50.0 %

MELT TEMP: 58.4 °C

<u>MOLECULAR WEIGHT:</u>	7401.9 g/mole
<u>EXTINCTION COEFFICIENT:</u>	239600 L/(mole·cm)
<u>nmole/OD<sub>260</sub>:</u>	4.17
<u>μg/OD<sub>260</sub>:</u>	30.89

#### MELTING TEMPERATURE SETTINGS

<u>TARGET TYPE:</u>	DNA
<u>OLIGO CONC</u>	0.25 μM
<u>Na<sup>+</sup> CONC</u>	50 mM monovalent salt
<u>Mg<sup>++</sup> CONC</u>	0 mM divalent salt
<u>dNTPs CONC</u>	0 mM nucleotide triphosphate

#### Reverso:

<u>SEQUENCE:</u>	5'- CTG AAG ATC TTC GTT TTC GCT GCC -3'
<u>COMPLEMENT:</u>	5'- GGC AGC GAA AAC GAA GAT CTT CAG -3'
<u>LENGTH:</u>	24
<u>GC CONTENT:</u>	50.0 %
<u>MELT TEMP:</u>	58.4 °C
<u>MOLECULAR WEIGHT:</u>	7285.8 g/mole
<u>EXTINCTION COEFFICIENT:</u>	211800 L/(mole·cm)
<u>nmole/OD<sub>260</sub>:</u>	4.72
<u>μg/OD<sub>260</sub>:</u>	34.40

#### MELTING TEMPERATURE SETTINGS

<u>TARGET TYPE:</u>	DNA
<u>OLIGO CONC</u>	0.25 μM

---

<u>Na<sup>+</sup> CONC</u>	50 mM monovalent salt
<u>Mg<sup>++</sup> CONC</u>	0 mM divalent salt
<u>dNTPs CONC</u>	0 mM nucleotide triphosphate

---