

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**TRANSCRIPTÓMA DE *Hymenoglossum cruentum* DURANTE UN CICLO DE DESECACIÓN-
REHIDRATACIÓN**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

GIOVANNI ANDRE LARAMA DENIS

**TEMUCO – CHILE
2014**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**TRANSCRIPTÓMA DE *Hymenoglossum cruentum* DURANTE UN CICLO DE DESECACIÓN-
REHIDRATACIÓN**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

GIOVANNI ANDRE LARAMA DENIS

PROFESOR GUÍA: DR. LEÓN ALOYS BRAVO RAMÍREZ

**TEMUCO – CHILE
2014**

**“TRANSCRIPTÓMA DE *Hymenoglossum cruentum* DURANTE UN CICLO DE DESECACIÓN-
REHIDRATACIÓN”**

PROFESOR GUÍA:

Dr. León A. Bravo Ramírez

Doctor en Ciencias

Departamento de Ciencias Agronómicas y
Recursos Naturales

Universidad de La Frontera, Temuco.

PROFESOR CONSEJERO:

Dra. Ana Gutiérrez Moraga

Doctora en Ciencias

Departamento de Producción Agropecuaria

Universidad de La Frontera, Temuco.

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS: _____

INDICE

1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	3
2.1 Estrés hídrico en plantas	3
2.2 Plantas de resurrección	3
2.2.1 Mecanismos bioquímicos y fisiológicos	4
2.2.2 Estrés mecánico durante la desecación	5
2.2.3 Expresión génica	5
2.2.4 Proteínas reguladoras	6
2.2.5 Cambios morfoestructurales	7
2.2.6 Fotosíntesis	7
2.2.7 Proteínas hidrofílicas	8
2.2.8 Estrés oxidativo	9
3. Justificación del estudio	11
3.1 Hipótesis	11
3.2 Objetivo general	11
3.3 Objetivos específicos	11
4. Metodología	12
4.1 Diseño experimental	12
4.2 Obtención y preparación de las muestras de ARN.	14
4.3 Secuenciación plataforma Illumina	14
4.3.1 Bioanalyzer	14
4.3.2 Preparación de librería	15
4.3.3 Illumina MiSeq	15
4.4 Análisis bioinformático	16
4.4.1 Control de calidad	16
4.4.2 Alineamiento	17
4.4.3 RSEM abundancia relativa	18

4.4.4	Análisis estadístico: edgeR	18
4.4.5	Identificación de genes	19
5.	Resultados y discusión	20
5.1	Extracción de ARN	20
5.2	Secuenciación plataforma illumina	21
5.3	Análisis bioinformático	23
5.3.1.	Control de calidad	23
5.3.2	Análisis estadístico: edgeR	23
5.3.3	Análisis global del transcriptoma	24
5.3.4	Grupos de genes	25
6.	Conclusiones	42
9.	Referencias bibliográficas	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de Haber-Weiss.

Figura 2. Mecanismos de detoxificación de superóxido.

Figura 3. Imágenes de *Hymenoglossum cruentum* durante un ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 4. Gráfico del CRA durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 5. Flujo de trabajo script IlluQC.

Figura 6. Electroforesis de muestras de ARN en gel no denaturante.

Figura 7. Electroforesis en Bioanalyzer 2100.

Figura 8. Electroferogramas de muestras de ARN en Bioanalyzer 2100.

Figura 9. Distribución de los valores de calidad en la secuenciación.

Figura 10. Gráfico de los porcentajes de secuencias según calidad.

Figura 11. Representación de los genes expresados diferencialmente entre las condiciones hidratado-desechado y desechado-rehidratado, según su abundancia y variación.

Figura 12. Variación de la abundancia relativa durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 13. Variación del porcentaje de transcritos expresados durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 14. Resultados InterPro de comp14833_c0_seq3.

Figura 15. Resultados InterPro de comp16233_c0_seq1.

Figura 16. Resultados InterPro de comp8097_c0_seq4.

Figura 17. Abundancia relativa de los genes de proteínas reguladoras durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 18. Resultados InterPro de comp20880_c0_seq1.

Figura 19. Resultados InterPro de comp13913_c0_seq1.

Figura 20. Abundancia relativa de genes de proteínas del citoesqueleto durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 21. Resultados InterPro de comp19765_c0_seq1.

Figura 22. Resultados InterPro de comp12199_c0_seq1.

Figura 23. Resultados InterPro de comp16196_c0_seq2.

Figura 24. Abundancia relativa de los genes relacionados con la fotosíntesis durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 25. Resultados InterPro de comp14632_c0_seq1.

Figura 26. Resultados InterPro de comp4045_c0_seq1.

Figura 27. Resultados InterPro de comp12617_c0_seq3.

Figura 28. Abundancia relativa de genes de proteínas hidrofílicas durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 29. Dominios encontrados por InterPro para los transcritos comp17425_c0_seq1 y comp4740_c0_seq1.

Figura 30. Abundancia relativa de los péptidos hidrofóbicos durante durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 31. Abundancia relativa de los genes de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 32. Resultados InterPro de comp16047_c0_seq2.

Figura 33. Resultados InterPro de comp16774_c0_seq1.

Figura 34. Abundancia relativa de los genes LTP y Ubiquitin Associated/TSN durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Figura 35. Abundancia relativa de los genes desconocidos durante el ciclo de desecación-rehidratación.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Q score, su equivalente en error y certeza.

Tabla 2. Reporte de salida de la secuenciación en Illumina Miseq

Tabla 3. Reporte de la secuenciación por muestras.

Tabla 4. Secuencias y ORF de proteínas reguladoras presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

Tabla 5. Secuencias y ORF de proteínas asociadas al citoesqueleto durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Tabla 6. Genes con dominio de unión a clorofila presente en el ciclo de desecación-rehidratación.

Tabla 7. Genes de proteínas hidrofílicas presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

Tabla 8. Genes de proteínas hidrofóbicas presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

Tabla 9. Genes de proteínas de estrés oxidativo presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

Tabla 10. Genes presentes sin función conocida con variación significativa en el ciclo de desecación-rehidratación.

RESUMEN

Hymenoglossum cruentum es una planta epífita vascular perteneciente a la familia *Hymenophyllaceae*, estas plantas son capaces de tolerar la desecación por periodos prolongados manteniendo en un estado deshidratado, sin sufrir un daño celular irreparable, siendo capaz de restablecer sus funciones una vez que se rehidrata. El entendimiento de los mecanismos de tolerancia presentes en *H. cruentum* podría ayudar a mejorar las herramientas de ingeniería genética para la tolerancia a estrés hídrico en cultivos de importancia comercial. Sin embargo, la escasa información presente en las bases de datos (3 secuencias en total) dificultan los estudios a nivel genético en esta planta. Hoy en día, el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación permite la secuenciación del transcriptoma de organismos sin la necesidad de poseer un genoma de referencia (*de novo*). El transcriptoma de *H. cruentum* fue secuenciado en tres etapas en un ciclo de desecación-rehidratación utilizando la plataforma Illumina MiSeq y ensamblado *de novo*, con el fin de identificar genes diferencialmente expresados que puedan relacionarse con mecanismos de tolerancia a desecación.

El análisis estadístico mostró una variación significativa ($P < 0.05$) en 297 genes durante el ciclo de desecación-rehidratación, la identificación se llevó a cabo utilizando el programa BLAST+ con la base de datos UniProt, siendo posible identificar cinco grupos interesantes de genes. El primero, un grupo de proteínas hidrofílicas llamadas LEA (detectándose los grupos ASR1, LEA-D113 y Dehidrinas) relacionadas con la estabilización de componentes celulares, la abundancia relativa de este grupo se incrementa de un 13.2 a un 28% durante el ciclo. Un segundo grupo de péptidos hidrofóbicos llamados RCI (Rare cold-inducible) de los cuales se ha descrito una función protectora asociada a membranas. Un tercer grupo de componentes del citoesqueleto, la expresión de la cadena ligera de dineína y una proteína formina se vieron alteradas, sugiriendo cambios en el citoesqueleto durante el ciclo de desecación-rehidratación. Un cuarto grupo de genes fueron los relacionados con respuesta a estrés oxidativo (Ferritina, glutatión-S-transferasa y Catalasa) y por último un grupo de factores de transcripción (DREB y DOG1). Estos resultados sugieren que los mecanismos de estabilización y las enzimas de detoxificación juegan un rol importante en la tolerancia a la desecación de *H. cruentum*.

SUMMARY

Hymenoglossum cruentum is an epiphyte filmy fern from *Hymenophyllaceae* family, these plants are capable of survive long periods of desiccation maintaining a dehydrated state without suffering significant cellular damage, being able to recover functionality after rehydration. Understanding tolerance mechanism in *H. cruentum* can help to improve genetic engineering tools for desiccation tolerance in crops with commercial importance. However, the lack of information (3 sequences stored in databases) has hampered the molecular approaches in *H. cruentum*. Nowadays development of new sequencing technologies allows sequencing transcriptomes of organism without the need of a reference genome (*de novo*). *H. cruentum* transcriptome was sequenced in three stages during a desiccation-rehydration cycle with Illumina MiSeq platform and the data was assembled *de novo* to identify differentially expressed genes that may be related with mechanisms of desiccation tolerance.

The results from statistical analysis showed 297 genes that vary significantly ($P < 0.05$) their expression level during dehydration and rehydration. Identification was carried out using BLAST+ software with UniProt database, being able to identify five interesting groups of genes. First, a group of hydrophilic proteins named LEA (detecting groups ASR1, LEA-D113 and Dehydrins) related to cellular components stabilization, this group increases their relative abundance from 13,2% to 28%. Second, up regulation of highly hydrophobic peptides bamed RCI (Rare Cold-Inducible) that has been shown to be localized in membranes performing a protective role. Third, a group of cytoskeleton components, the expression of dynein light chain and formin-like protein were altered, suggesting changes in cytoskeleton during desiccation-rehydration cycle. Fourth, a group of stress related proteins, up regulation of oxidative stress response (Ferritin, glutathione S-Transferase and Catalase) and finally two transcription factors (DREB and DOG1). These data suggest that stabilization of cellular components and detoxification enzymes may be important mechanism of desiccation tolerance in *H. cruentum*.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés hídrico es un factor importante en la rentabilidad de un cultivo comercial, ya que la disponibilidad de agua está directamente relacionada con la generación de biomasa en plantas, es por esto que programas de mejoramiento genético se han enfocado en buscar plantas que sean tolerantes al estrés hídrico.

Para mejorar la tolerancia al estrés hídrico se ha recurrido al estudio de organismos capaces de tolerar una gran pérdida de agua (90% - 95% del contenido intracelular), estos organismos poseen mecanismos capaces de resistir la pérdida de agua sin sufrir un daño celular que implique la muerte celular. En este grupo de organismos se encuentran representantes del reino plantae, si bien la mayoría de ellos corresponde a plantas no vasculares, tales como líquenes, musgos y briofitos, existe un reducido grupo de plantas vasculares que poseen tolerancia a la desecación.

Las plantas vasculares tolerantes a la desecación se conocen como **plantas de resurrección**, su nombre es debido a su carácter poiquilohídrico, es decir ajustan su contenido relativo de agua intracelular dependiendo de la humedad relativa del ambiente. Pueden tolerar incluso contenidos de agua menor a un 10% sin sufrir daño celular, manteniéndose en un estado inactivo, lo que permite que recupere su funcionalidad una vez que exista disponibilidad de agua en el ambiente, esto es lo que se denomina “resurrección”.

Las plantas de resurrección son de gran interés dado el grado de tolerancia a la desecación que presentan, es por ello que se han realizado diversas aproximaciones fisiológicas y moleculares para comprender los mecanismos que utilizan.

Entre las aproximaciones moleculares, el estudio de la expresión génica de un individuo sometido a estrés es capaz de entregar genes candidatos de los cuales su expresión se relaciona directamente con el estrés, siendo posible de esta forma identificar mecanismos de tolerancia al estrés hídrico.

Esta aproximación ha permitido la identificación de diversos mecanismos entre los que se encuentran la expresión de genes que codifican proteínas con funciones protectoras tales como

las proteínas LEA (late embryogenesis abundant) y otras proteínas hidrofílicas, la expresión de genes con funciones reguladoras (factores de transcripción y ARNs), genes codificantes para enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos para la síntesis de solutos compatibles y la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de agua y otras moléculas.

El estudio en las plantas de resurrección como modelo de tolerancia a la desecación ha sido bastante diverso debido a su amplia distribución geográfica, abarcando principalmente el hemisferio sur de África, India, Australia y América del Sur. En Chile se encuentran representadas por cuatro géneros (*Hymenophyllum*, *Serpyllois*, *Trichomanes* e *Hymenoglossum*), que se distribuyen principalmente desde la región del Maule a la región de Magallanes. Abarcando un gradiente de precipitación y temperatura amplio, desde una zona típicamente mediterránea hasta los bosques magallánicos con un clima templado lluvioso o templado frío.

Para el presente estudio se utilizaron muestras de *Hymenoglossum cruentum* presentes en la parque Katalapi de la provincia de Llanquihue, Región de Los Lagos.

El transcriptoma de *H. cruentum* fue secuenciado utilizando la técnica de secuenciación por síntesis en plataforma Illumina, lo que permite obtener millones de copias de los ARNm que estaban presentes en las diferentes condiciones evaluadas. La ventaja de las técnicas de secuenciación masiva, es que actualmente la necesidad de un genoma de referencia necesario en el caso de microarreglos se ve subsanada por la presencia de algoritmos capaces de reconstruir los transcritos presentes en las muestras, permitiendo la secuenciación de este tipo de organismos los cuales no presentan su genoma secuenciado.

La secuenciación permitirá la identificación de genes candidatos en las condiciones de estrés hídrico, que podrían ser responsables de la tolerancia a la desecación mostrada por *H. cruentum*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrés hídrico en plantas

Los tejidos vegetativos de la mayoría de las plantas vasculares son incapaces de sobrevivir a condiciones ambientales donde exista una baja disponibilidad de agua, dicha tolerancia sólo se ha visto presente en tejidos reproductivos (polen, esporas y semillas). Es por ello que se han desarrollado programas de mejoramiento genético enfocados en el estudio de organismos tolerantes a la desecación en la búsqueda de mecanismos que pudiesen ser transferidos a especies susceptibles al estrés hídrico (Peters *et al.*, 2007).

La tolerancia a la desecación se ha definido como la habilidad de un organismo para equilibrar su contenido relativo de agua intracelular con el potencial hídrico del entorno, pudiendo perder la mayoría de su agua intracelular (>90%), sin generar daños irreversibles en el organismo, permitiendo volver a sus funciones normales una vez exista nuevamente la disponibilidad de agua en el ambiente (Alpert P., 2000).

La tolerancia a la desecación ha sido observada a través de todo el reino plantae, siendo más común en líquenes, briofitos, helechos y una característica escasa en plantas vasculares, encontrada en cerca de 330 especies (Porembski y Barthlott, 2000). Estas plantas vasculares que presentan tolerancia a la desecación en sus tejidos vegetativos, son también llamadas plantas de resurrección (Gaff DF, 1971).

2.2 Plantas de resurrección

Las plantas de resurrección son un pequeño grupo de plantas angiospermas vasculares tolerantes a la desecación, que son capaces de resistir pérdidas severas de agua, encontradas principalmente en lugares donde la lluvia es estacional y esporádica (Gaff DF, 1987). En estas condiciones se ven sometidas a constantes ciclos de desecación y rehidratación durante el año, siendo capaces de mantener sus tejidos desecados por meses hasta que exista nuevamente disponibilidad de agua, momento en el cuál se rehidratan y recuperan sus actividades

fisiológicas (Bernacchia *et al.* 1996).

El entendimiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares que poseen estas plantas para tolerar la desecación de sus partes vegetativas, debería facilitar el mejoramiento de los cultivos frente al estrés hídrico (Toldi O. *et al.*, 2009; Bartels D. *et al.*, 2001). Sin embargo las diversas aproximaciones en proteómicas y transcriptómicas, han sido obstaculizadas por la falta de información genómica y bases de datos de EST (Expressed Sequence Tags) que apoyen los estudios en plantas de resurrección (Moore JP *et al.*, 2009). Debido a esto, estudios como los realizados en los proteomas de hojas en *Xerophyta viscosa* durante la desecación, han permitido identificar una baja cantidad (30%) de los polipéptidos presentes (Ingle RA *et al.*, 2007).

2.2.1 Mecanismos bioquímicos y fisiológicos.

El plegamiento de las hojas es uno de los cambios más notorios en las plantas de resurrección sometidas a desecación, este permite reducir el daño oxidativo causado por la radiación UV (Gaff DF *et al.*, 1989). Este mecanismo es importante para la tolerancia a la desecación, ya que se ha comprobado que plantas como *Craterostigma wilmsii* no sobreviven a la desecación durante el día si se previene mecánicamente el plegamiento de las hojas (Farrant JM *et al.*, 2003). Un mecanismo bioquímico importante durante la desecación es la acumulación de azúcares solubles como la glucosa mediante la degradación del almidón (Crowe JH *et al.*, 1998). Además de un rol en el ajuste osmótico durante la desecación, la función protectora de estos azúcares puede incluir la estabilización de las células desecadas mediante la formación de cristales en un proceso llamado vitrificación (Ramanjulu S y Bartels D, 2002). La vitrificación además de proteger el daño en organelos, los cambios conformacionales de las proteínas y la fusión de las membranas, también ayuda en disminuir la producción de radicales libres al ralentizar las reacciones químicas (Buitink J y Leprince O, 2004; Crowe JH *et al.*, 1998; Hoekstra FA, 2005). Considerándose uno de los mecanismos importantes en respuesta a la desecación presente en plantas de resurrección.

Otros compuestos sintetizados durante la desecación son los solutos compatibles, moléculas orgánicas no tóxicas tales como prolina, manitol y glicina-betaina (Chen TH y Murata N, 2002). Si bien la acumulación de solutos compatibles provoca un aumento en la osmolaridad y por ellos sirve para disminuir el eflujo de agua desde la célula, su principal función es la estabilización de los componentes celulares (Hare PD *et al.*, 1998).

2.2.2 Estrés mecánico durante la desecación.

Un problema que se presenta durante la desecación es la reducción del volumen celular, dado principalmente por la pérdida de agua desde las células provocando el encogimiento de la vacuola central. Esto provoca una tensión entre el plasmalema y la pared celular, la cual exhibe una elasticidad limitada. Si la membrana celular se despegaba de la pared celular, las conexiones del plasmalema se romperían, siendo letal para la célula (Cosgrove D.J., 2000).

Se han adquirido adaptaciones para reducir el estrés mecánico, tales como la presencia de un plegamiento de la pared celular acompañando el encogimiento del protoplasto, provocando la contracción de la célula completa evitando el desgarramiento del plasmalema desde la pared celular (Farrant J.M. y Sherwin H.W., 1997; Thomson W.W. y Platt K.A. 1997). Recientemente se ha visto en plantas de resurrección como *C. wilmsii* o *M. flabellifolius* un alto grado de flexibilidad en su pared celular, dado principalmente a una composición específica en la pared celular. En *C. wilmsii*, se ve un incremento significativo de xiloglucanos y pectinas no esterificadas en la pared celular en respuesta a la desecación, también observándose una reducción de glucosa en la fracción de hemicelulosa (Vicré M. *et al.*, 1999; Vicre M. *et al.*, 2004). Estos cambios ayudan a mejorar la fuerza tensora de la pared celular, permitiendo su contracción y plegamiento sin colapsar durante la desecación.

2.2.3 Expresión génica.

Pocas plantas de resurrección han sido estudiadas a nivel molecular, las más utilizadas han sido *Craterostigma plantagineum*, *Xerophyta viscosa*, *Xerophyta humilis*, *Sporobolus stapfianus* y *Boea hygrometrica*. De estos estudios se ha desprendido que la expresión génica en plantas de

resurrección cuando se someten a estrés hídrico, se orienta principalmente a la síntesis de moléculas protectoras tales como azúcares solubles (Bartels D. y Hussain S., 2011). Sin embargo, existen genes que pueden actuar de forma directa, siendo codificantes para proteínas protectoras incluyendo hidrófilas y enzimas detoxificantes, y productos génicos con función reguladora (proteínas y ARNs), además una respuesta indirecta de genes codificantes para enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y proteínas envueltas en el transporte de agua (Bartels D., 2005).

Las investigaciones a nivel de transcritos en plantas de resurrección se remontan al año 2000, cuando Neale *et al.* construyeron una librería de ADNc de hojas sometidas a desecación de la planta *Sporobolus stapfianus*, donde se encontraron genes relevantes para la tolerancia a la desecación tales como proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) y ELIP (Early Light-Inducible Protein). Siguiendo con aproximaciones más globales para el estudio de patrones expresión génica, como la construcción de microarreglos por parte de Collet *et al.* (2004) con 424 ADNc, permitiendo la comparación de los transcriptomas en estado desecado e hidratado de *Xerophyta humilis*. Estas aproximaciones han permitido la identificación de diversos genes relacionados con una tolerancia al estrés hídrico, siendo una importante fuente de información para entender los mecanismos moleculares presentes en la planta durante la desecación e identificar cuáles genes deben ser necesariamente expresados para que exista tolerancia a la desecación.

2.2.4 Proteínas reguladoras.

Los factores de transcripción son las proteínas que regulan la transcripción génica al interior de la célula, pudiendo actuar como interruptores que se encargan de responder frente a estímulos externos tales como la desecación. Sin embargo, se han realizado pocos estudios de los mecanismos de regulación de la expresión génica en plantas de resurrección. Siendo el grupo de investigación de Bartels el más activo en este campo, caracterizando varios elementos reguladores en *Craterostigma plantagineum*, en donde se ha visto que las respuestas se

encuentran mediadas por vías de señalización que pueden o no depender de ABA (Ácido Abscísico), al igual que en plantas no tolerantes a la desecación (Bartels D., 2005).

Dentro de los genes reguladores encontrados en estudios de desecación en *Arabidopsis thaliana* (Yamaguchi-Shinosaki K. y Shinozaki K. 1993), se encontraron los elementos de respuesta a la deshidratación (DRE). Estos poseen importancia al estar presente en las regiones reguladoras de muchos genes de respuesta a estrés hídrico donde actúan los factores de transcripción DRE/CBF (DRE/C-repeat Binding Factor) (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Estos factores de transcripción poseen un dominio AP2, el cual es un motivo de unión al ADN de aproximadamente 60 aminoácidos, por lo que pertenece a la familia AP2/EREBP (Ethylene-responsive element binding protein) la cuál es importante para la regulación del desarrollo floral y la respuesta de plantas a estreses abióticos (Shigyo *et al.*, 2006).

2.2.5 Cambios morfo estructurales

Uno de los efectos más visibles durante la desecación en plantas de resurrección es el plegamiento o enrollamiento de las hojas, las cuales se encuentran totalmente expandidas cuando están hidratadas y comienzan a curvarse durante la desecación (Sherwin HW y Farrant JM, 1998). Estudios en *Craterostigma wilmsii* han demostrado que esta adaptación morfológica tiene como objetivo la limitación del estrés oxidativo generado por la incidencia de radiación UV, siendo importante durante la desecación en exposición a la radiación solar (Farrant JM *et al.*, 2003).

Estos cambios morfológicos sugieren un reacondicionamiento de la estructura del citoesqueleto en respuesta a los estímulos externos. Sobre esto, Wang C. *et al.* (2011) ha destacado el rol que juega el citoesqueleto en la respuesta a estrés osmótico, siendo altamente dinámico y complejo.

2.2.6 Fotosíntesis

Durante la desecación las plantas de resurrección inactivan su aparato fotosintético, lo que pueden realizar de dos maneras, en plantas poiquiloclorofílicas se realiza mediante el desensamblaje del aparato fotosintético, de esta forma evitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO). La capacidad fotosintética se recupera durante la rehidratación donde es resintetizado el aparato fotosintético. Este mecanismo es común en plantas de resurrección que se mantienen desecadas por periodos largos. En plantas homeoclorofílicas, se mantienen los componentes del aparato fotosintético, sin embargo son inactivados por modificaciones estructurales en los cloroplastos y en las membranas de los tilacoides, este mecanismo permite una recuperación más rápida de la actividad fotosintética, ya que no deben sintetizar nuevamente sus componentes (Tuba Z. *et al.*, 1998). Común en plantas de resurrección que se desecan en forma recurrente por periodos cortos.

Estudios en los cloroplastos de *Craterostigma plantagineum* (Alamillo J. y Bartels D., 2001) y *Sporobolus stapfianus* (Neale A.D. *et al.*, 2000) han encontrado la presencia de proteínas con alta similitud a ELIPs (Early light-inducible protein). Estas proteínas se sintetizan en tejidos expuestos a un exceso de luz u otro estrés abiótico que puedan causar un exceso de radicales libres (Montane M. *et al.*, 1997). Son descritas como componentes de la membrana de los tilacoides que tienen unión a pigmentos, postulando que poseen roles protectores frente al daño foto oxidativo en el cloroplasto (Zeng Q. *et al.*, 2002), además preservan los complejos proteína-clorofila evitando que se degraden (Montane M. *et al.*, 1997) y mantener bajo los contenidos de clorofila libre en condiciones de estrés (Hutin C. *et al.*, 2003).

2.2.7 Proteínas hidrofílicas.

Existe un grupo de proteínas altamente hidrofílicas, conocidas como proteínas LEA (Late embryogenesis abundant). Estas proteínas se acumulan en altos niveles durante la adquisición de tolerancia a la desecación en semillas en las últimas etapas de la maduración y en órganos vegetativos durante la desecación, por lo que sugieren un rol protector frente al estrés hídrico (Dure L., 1993a; Hoekstra F.A. *et al.*, 2001).

Si bien existen datos estructurales obtenidos por programas de modelación y predicción de estructuras que sugieren una conformación estructural para las diferentes familias de proteínas LEA, se ha determinado experimentalmente que todas las proteínas LEA hidrofílicas poseen un alto grado de inestabilidad cuando se encuentran en solución (Dure L. *et al.*, 1989; Dure L. *et al.*, 1993b), esto debido a que se encuentran en conformación “random coil”, es decir, forman una gran cantidad de puentes de hidrógeno intermoleculares con moléculas de agua vecinas y pocos puentes de hidrógeno intramoleculares entre sus residuos (Tompa P., 2002; Tompa P. *et al.*, 2005).

Se sugiere que estas proteínas cumplan un rol de chaperona, con el que mantiene la estructura de las proteínas en condiciones de desecación o congelación. Es por ello que se han realizado experimentos para determinar la capacidad de estabilizar proteínas durante ciclos de desecación-rehidratación, donde se ha visto que las proteínas LEA son capaces de mantener la actividad de las enzimas e impiden su agregación de una forma dependiente de la concentración a la que se encuentren (Goyal K. *et al.*, 2005).

Se han realizado experimentos donde se expresan algunas proteínas hidrofílicas (LEA) en plantas, donde se ha visto un incremento en la tolerancia al estrés hídrico donde se ha visto un retraso en la presencia de daño, con una mejor maquinaria antioxidante y un mejor balance mineral, como reflejo de bajos niveles de peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos (Brini F. *et al.* 2007; RoyChoudhury A. *et al.*, 2007).

2.2.8 Estrés Oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno son comunes en los organismos aeróbicos, se estima que el 1% del oxígeno consumido por plantas se deriva a la producción de especies reactivas de oxígeno (Asada K., 2006). Los radicales libres en plantas están involucrados en diversos procesos de señalización celular como el envejecimiento, la caída de las flores, la respuesta a heridas y ataques de patógenos, además de ser una respuesta recurrente en condiciones de estrés (Bowler C. *et al.*, 1992).

La generación de ERO en bajas concentraciones es necesaria para actuar como aceptores de electrones para la disipación de energía o como moléculas de señalización celular, sin embargo estas pueden formar especies dañinas para componentes celulares importantes. En presencia de iones metálicos (tales como Hierro) el superóxido y el peróxido pueden reaccionar en la ecuación de Haber-Weiss (Figura 1) para formar radicales hidroxilos (Bowler C. *et al.*, 1992; Edreva A., 2005).

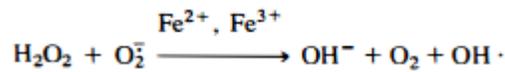


Figura 1 Reacción de Haber-Weiss

En condiciones de déficit hídrico los estomas se cierran limitando el flujo de CO₂ al cloroplasto, inhibiendo la fijación de carbono y causando la sobre excitación de las clorofilas, las cuales transfieren su energía al oxígeno generando singletes y especies reactivas de oxígeno. Los radicales hidroxilos se encuentran entre las especies más reactivas conocidas, capaces de reaccionar indiscriminadamente, pudiendo causar peroxidación de lípidos, denaturación de proteínas, y mutaciones en el ADN (Fridovich I., 1986). Para controlar los niveles de ERO existen sistemas antioxidantes que se encargan de remover el exceso y mantener un balance redox al interior de las células, evitando las alteraciones que pudiesen provocar su ausencia o exceso (Edreva A., 2005; Apel K y Hirt H., 2004).

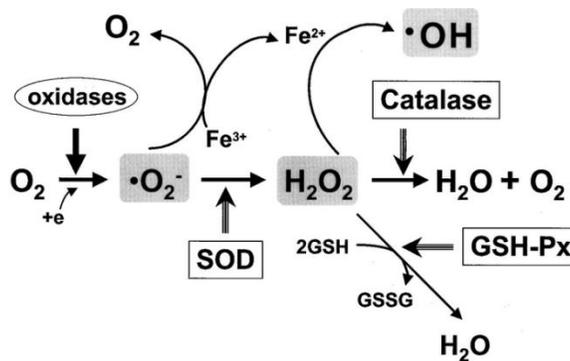


Figura 2 Mecanismos de detoxificación de superóxido.

Entre los mecanismos enzimáticos para el control de la homeostasis redox se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la cual es la encargada de la etapa inicial de detoxificación al catalizar la dismutación del $\cdot O_2^-$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cuál posteriormente puede ser convertido a agua por la Catalasa y Glutación Peroxidasa (GSH-Px) (Baier M. y Dietz K.J., 2005; Dietz K.J. 2003).

Diversos estudios donde se han sobre expresados proteínas relacionadas con la protección frente a estrés oxidativo, han demostrado que el aumento en la expresión de estas proteínas puede aumentar la tolerancia a estrés salino, así como hídrico (Badawi G.H. *et al.*, 2004; Wang F. *et al.*, 2005). Sugiriendo un posible mecanismo presente en plantas de resurrección para evitar la sobre producción de EROs durante la desecación, de esa forma reduciendo el daño así como lo observado en *Xerophyta viscosa* (Mowla S.B. *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

3.1 HIPOTESIS

La desecación conlleva a la expresión de genes encargados de llevar a cabo mecanismos específicos tales como síntesis de proteínas estabilizadoras de la estructura celular, sistema antioxidante y mecanismos de protección del aparato fotosintético, lo que otorga la tolerancia a la desecación en *Hymenoglossum cruentum*.

3.2 OBJETIVO GENERAL

◆ Analizar el transcriptoma de *Hymenoglossum cruentum* durante un ciclo de desecación-rehidratación para la búsqueda de genes asociados a la tolerancia a la desecación.

3.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

◆ Comparar los transcriptomas de los estados hidratado, desecado y rehidratado para la elección de genes diferencialmente expresados.

◆ Identificar genes diferencialmente expresados y buscar su función en las diferentes etapas del ciclo de desecación-rehidratación.

4. METODOLOGÍA

El diseño experimental se realizó en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal de la Universidad de La Frontera, Temuco. Las muestras fueron posteriormente enviadas a secuenciar al Laboratorio de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor, campus Huechuraba, Santiago. Finalmente el análisis bioinformático se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal en conjunto con el Centro de Modelación y Computación Científica de la Universidad de La Frontera.

4.1 Diseño experimental

Las plantas de *Hymenoglossum cruentum* fueron colectadas desde el centro de investigación y educación parque Katalapi, región de Los Lagos y trasladadas al laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal, donde fueron mantenidas en un vivero con riego automatizado.



Figura 3 *Hymenoglossum cruentum* en condiciones Hidratado (CRA = 99%) Desechado 7 días (CRA = 19%) y Rehidratado 3 horas (CRA = 88%)

Para el ciclo de desecación-rehidratación, las muestras se mantuvieron con riego constante por 4 horas donde se alcanzó un contenido relativo de agua (CRA) de 99%, la desecación se llevó a cabo suprimiendo el riego por 7 días, y la rehidratación mediante la reanudación del mismo.

Las muestras fueron tomadas en el estado completamente hidratado (FH) después de 4 horas de rehidratación, para el estado desecado con el fin de obtener información sobre la expresión de los genes al comienzo y fin de la desecación se realizó un pool conteniendo muestras extraídas a las 4 horas comenzada la desecación (CRA = 54%) y a los 7 días de desecación (CRA = 19%), con el mismo objetivo de obtener información al comienzo y final del estado rehidratado, se compuso un pool con muestras extraídas a los 15 minutos de riego (CRA = 44%) y después de 3 horas de riego (CRA = 88%).

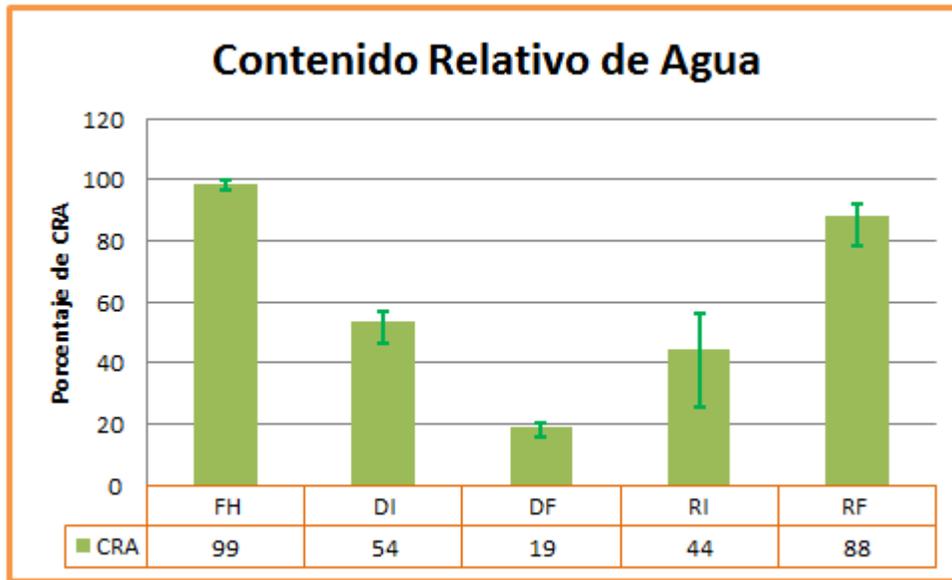


Figura 4 Gráfico del contenido relativo de agua durante las condiciones de hidratación (FH), desecación inicial (DI), desecación final (DF), rehidratación inicial (RI) y rehidratación final (RF)

Los contenidos relativos de agua se calcularon utilizando la fórmula:

$$CRA = [(Pf - Ps)/(Pt - Ps)] * 100$$

Pf = peso fresco

Ps = peso seco

Pt = peso turgente

4.2 Obtención y preparación de las muestras de ARN.

Las muestras de ARN fueron extraídas a partir de aproximadamente 150 mg de frondas pulverizadas con nitrógeno líquido, utilizando el kit comercial UltraClean™ Plant RNA Isolation, el cuál se basa en una lisis celular para la liberación del material genético que es posteriormente capturado mediante la utilización de columnas con membranas de sílice, una vez en las columnas se procede a realizar lavados con soluciones de etanol y finalmente se libera de la columna con la aplicación de agua libre de nucleasas tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) para su conservación.

Las muestras de ARN fueron revisadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v para visualizar la integridad de las muestras.

Debido a la presencia en ADN las muestras, fueron tratadas con DNAsa I e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una purificación utilizando las columnas con membrana de sílice del kit comercial E.Z.N.A. total RNA.

Las muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría midiendo las absorbancias a 260 nm y 280 nm de longitud de onda utilizando el equipo Infinite M200 Nanoquant Pro.

En base a las concentraciones y calidad se realizaron los pools descritos en el diseño experimental, los cuales fueron precipitados con 2 volúmenes de etanol 100% y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M (preparado con ADESI-DEPC) y enviados al centro de genómica y bioinformática de la U. Mayor.

4.3 Secuenciación en plataforma Illumina MiSeq

4.3.1 Bioanalyzer

La calidad del ARN fue confirmada mediante la utilización del equipo Agilent 2100 Bioanalyzer. Este equipo realiza una separación en base a tamaño mediante la aplicación de un campo eléctrico, donde las moléculas más pequeñas migran a mayor velocidad, finalmente los resultados son mostrados en forma de imagen y electroferogramas.

El software compara las muestras con los fragmentos del marcador para determinar la concentración e identificar los picos de ARN ribosomal de la muestra.

Una vez obtenidos los picos de ARN el software se encarga de estimar la calidad de este mediante la asignación de un valor RIN (Schroeder *et al.*, 2006), el cual se basa en la integridad de los picos (tamaño) y su relación de área ($28S/18S > 2.0$). La escala va de 1 a 10, donde 1 corresponde a las muestras más degradadas y 10 para las muestras más integras, siendo un valor sobre 6.0 aceptable para la secuenciación.

4.3.2 Preparación de la librería

La preparación de la librería se realizó con el kit TruSeq® Stranded Total RNA LT. El primer paso es la remoción del ARN ribosomal utilizando oligonucleótidos con biotina específicos, combinados con Ribo-Zero.

Después de la purificación, el ARN es fragmentado utilizando cationes divalentes a altas temperaturas. Luego de la fragmentación se procede a la síntesis de la primera hebra de ADNc utilizando una transcriptasa reversa y random primers. Finalmente se sintetiza una segunda hebra utilizando una ADN polimerasa y se elimina el ARN con RNAsa H.

A los fragmentos de ADNc se le adiciona una base adenina y se ligan los adaptadores en ambos extremos (Paired-end). Estos productos son purificados y amplificados por PCR para crear la librería final de ADNc.

4.3.3 Illumina MiSeq

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma illumina MiSeq, con el sistema de secuenciación por síntesis en el que se generan millones de fragmentos en paralelo, siendo adherido un nucleótido por ciclo y registrado durante la secuenciación. Se realizaron dos rondas de 151 ciclos (2x151) utilizando 12 pM de la librería ADNc de cada muestra.

Muestra	Adaptador
HCF	GTGAAA
HCD	ACAGTG
HCR	CGATGT

Tabla 1. Adaptadores correspondientes a las diferentes muestras.

Las muestras fueron secuenciadas en una reacción multiplex, utilizando diferentes adaptadores para cada una de ellas (Tabla 1.) permitiendo la separación de las muestras una vez terminado el experimento.

4.4 Análisis bioinformático

El análisis de control de calidad, alineamiento y estimación de la abundancia relativa se realizó utilizando el cluster “Troquil” operado con sistema Linux Enterprise Server, compuesto

por 96 procesadores Intel® Xeon® E5-4640 2.40 GHz y 192 GB RAM, ubicado en el Centro de Modelación y Computación Científica (CMCC) en la Universidad de La Frontera.

El análisis estadístico y búsqueda en bases de datos se realizó utilizando un servidor operado con sistema Ubuntu Linux v12.04, con procesador Xeon E3-1290 y 32 GB de memoria RAM ubicado en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal.

4.4.1 Control de calidad

Las nuevas plataformas de secuenciación masiva generan una gran cantidad de información la cual no está exenta de errores, pudiendo contener artefactos, errores de lectura y contaminación por adaptadores. Es por ello que es necesario realizar un filtrado de las secuencias ya que pueden tener un impacto negativo en los análisis posteriores.

El software NGS QC Toolkit (Patel R.K. y JainM., 2012) basado en lenguaje de programación Perl contiene herramientas para el control de calidad y filtrado de las secuencias. El filtro se realiza en base al valor de calidad Phred (Q Score), el cual representa la probabilidad de que una base haya sido ingresada erróneamente.

Q score	Error	Certeza
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1000	99,9%
40	1 en 10000	99,99%

Tabla 1 Q Score: su equivalente en error y certeza.

El análisis se realizó utilizando el script IlluQC de NGS QC Toolkit para eliminar las secuencias con un valor de Q menor a 30, generando un nuevo archivo conteniendo un mínimo de certeza en la adición de bases de 99,9% y la estadística de los datos.

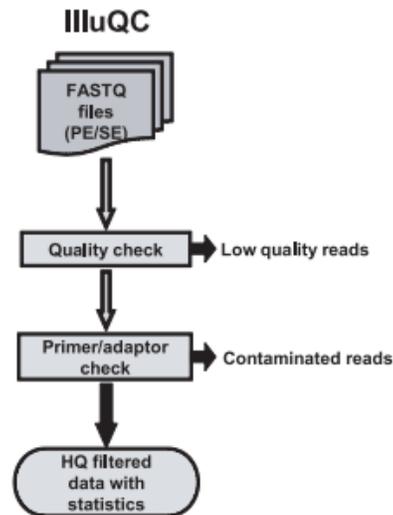


Figura 5 Flujo de trabajo Script IlluQC.

4.4.2 Alineamiento: Trinity; inchworm, chrisallys y butterfly.

Trinity es un nuevo método para la reconstrucción *de novo* de transcriptomas a partir de una gran cantidad de secuencias (RNA-Seq). Este software combina tres módulos independientes: Inchworm, Chrysalis y Butterfly, aplicados en dicho orden para el análisis de datos de secuenciación masiva (Grabherr M. *et al.*, 2011).

Trinity basa su metodología en la utilización de un algoritmo extensivo que aplica grafos de bruijn, la utilización de estos grafos permite la construcción eficiente de gran cantidad de nodos, para la evaluación de todas las posibles soluciones.

Inchworm realiza el ensamblaje de las secuencias utilizando k-mers para ubicar similitud entre ellas, de esa forma las une pudiendo generar los transcritos del largo completo (gen completo), sin embargo no es capaz de distinguir entre variaciones (isoformas) que pudiesen existir en la muestras)

Chrysalis se encarga de agrupar los contigs generados por inchworm y dejando un grupo para cada grafo de bruijn. Cada grupo representa el transcrito completo de un gen dado, chrysalis se encarga de particionar el transcrito para su reensamblaje en búsqueda de isoformas.

Butterfly procesa cada grafo en paralelo, buscando las rutas entre las secuencias que puedan llevar a la identificación de una nueva variante del transcrito completo (Splicing alternativo).

4.4.3 RSEM abundancia relativa

Para estimar la abundancia de los transcritos se utilizó el software RSEM (Li B. y Dewey C. N., 2011), este programa permite el análisis transcriptómico sin la necesidad de tener un genoma de referencia, permitiendo la utilización de secuencias dadas por el usuario, en este caso se utilizaron las secuencias producidas por alineamientos *de novo* generado con Trinity.

RSEM realiza un alineamiento con el programa Bowtie entre las secuencias de referencia con las lecturas generadas en la secuenciación, de esa manera ir distribuyendo los fragmentos entre los genes obtenidos con el alineamiento al utilizar Trinity, y estimar la abundancia relativa convirtiéndola en un valor numérico.

4.4.4 Análisis estadístico: edgeR

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete edgeR (Robinson M.D.*et al.*, 2010) del software Bioconductor para la búsqueda de transcritos expresados diferencialmente. Utilizando un modelo de Poisson más disperso para ajustar la variabilidad técnica y biológica. Se utilizan métodos bayesianos para moderar el grado de dispersión mejorando la confiabilidad de la inferencia.

Se aplicó un valor de significancia de 0,05% (IC 95%) para la selección de genes candidatos en las tres condiciones evaluadas.

4.4.5 Identificación de genes.

Para la identificación de genes se realizó una búsqueda en base a la similitud de secuencia, utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST+ con las bases de datos *nr* de genbank

(Benson D. *et al.*, 2012), y *swissprot* y *TrEMBL* de UniProt (Leinonen R., *et al.* 2009) instaladas localmente para la realización de búsquedas múltiples.

Se analizaron los marcos de lectura posible y esas proteínas fueron analizadas realizando una búsqueda integrada con el programa ***InterProScan*** (Quevillon E. *et al.*, 2005) que integra bases de datos de sitios y dominios conservados (como ProSite) las que pueden dar información respecto a la función y a la familia de proteínas que pertenece la secuencia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción de ARN

Las muestras de ARN posterior purificación con DNAsa I se revisaron por medio de electroforesis en gel de agarosa 1.5% para confirmar su integridad,

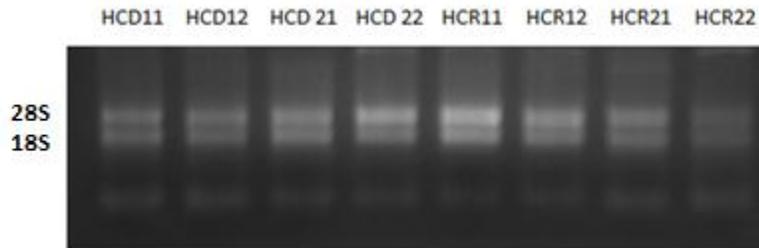


Figura 6 Electroforesis en gel no denaturante al 1,5% de agarosa, se observa la integridad de los ARN ribosomales 28S y 18S correspondientes a cada muestra.

Las muestras de ARN fueron precipitadas para la formación de pools que presentaran la concentración mínima requerida por muestra (>1ug), reduciéndose a sólo 3 muestras concentradas (hidratado = HCF, desecado = HCD y rehidratado = HCR).

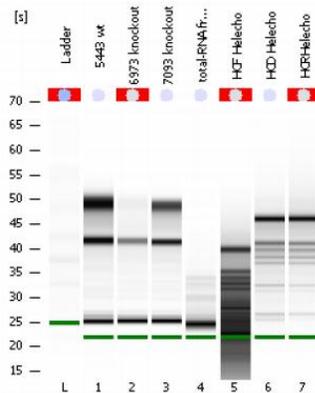


Figura 7 Electroforesis Bioanalyzer 2100
Carril 5 = HCF, Carril 6 = HCD y Carril 7 = HCR.

Por medio de la revisión mediante Bioanalyzer se observó un valor de RIN de 6,8 para la muestra HCD (Figura 7B), siendo suficiente para la secuenciación. La muestra HCR y HCF no obtuvieron valores de RIN, pero en ellas se

observan a simple vista las bandas de las subunidades ribosomales además de poseer un patrón similar a HCD (con RIN de 6,8), asumiendo la ausencia de RIN a limitaciones del programa de análisis de imágenes.

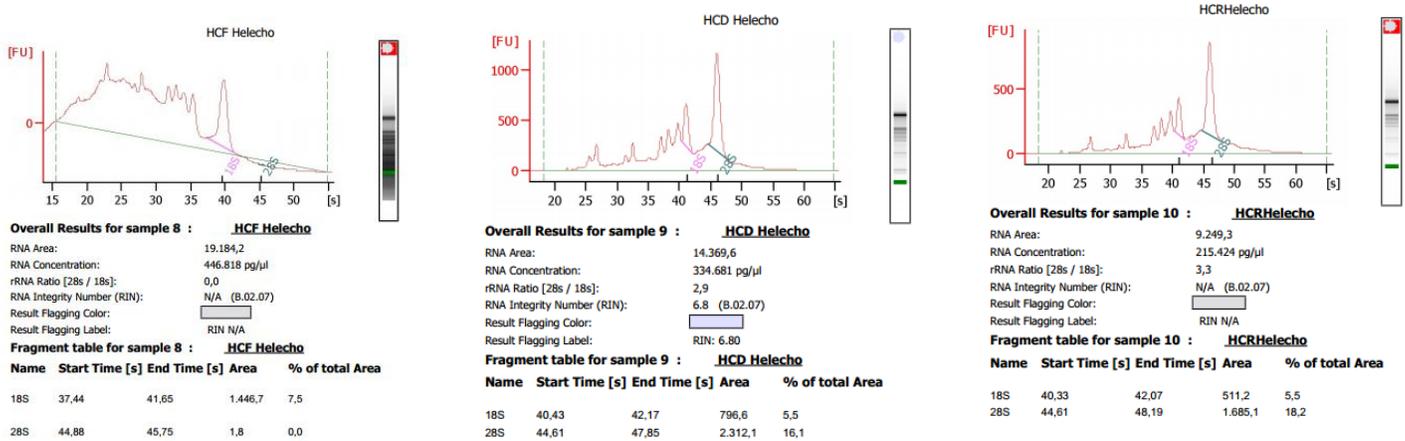


Figura 8 Electroferogramas muestras de ARN total, Bioanalyzer 2100

HCF = *Hymenoglossum cruentum* hidratado.

HCD = *Hymenoglossum cruentum* desecado.

HCR = *Hymenoglossum cruentum* rehidratado.

Si bien la muestra HCF no presenta una gran cantidad de picos (Figura 6A), esto se debe a la gran concentración de ARN contenida en las muestras lo que dificulta la diferenciación del patrón presente, a esto se le suma el error en la migración lo que provocó una migración más rápida dificultando la comparación con los patrones presentes en la electroforesis. Al presentar errores en la medición (RIN = N/A) la calidad fue estimada visualmente mediante la comparación con los patrones de migración de las muestras presentes (Figura 5).

5.2 Secuenciación plataforma Illumina

Los resultados de la secuenciación mostrados en la tabla 3, muestran que se generaron 13.984.369 lecturas, de las cuales 12.596.956 (98.99%) fueron identificadas como secuencias en

base a la presencia de sus adaptadores, de estas se estimó que un 31.17% de las secuencias correspondían a HCF (1,31 Gb), un 34.79% a HCD (1,46 Gb) y un 33,04% a HCR (1,38 Gb).

Total Reads	PF Reads	% Reads Identified (PF)	CV	Min	Max
13984369	12596956	98.9977	0.0548	31.1716	34.7868

Tabla 2 Resumen de la secuenciación en Illumina MiSeq mostrando el número total de reads generados, el número de reads que se consideran secuencias (PF Reads) y su porcentaje (% Reads Identified), la covarianza (CV) y el mínimo (Min) y máximo (max) porcentaje obtenido para cada muestra.

Index Number	Sample ID	Project	Index 1 (17)	Index 2 (15)	% Reads Identified (PF)
1	HCF	PROYECTO HELECHOS	GTGAAA		31.1716
2	HCD	PROYECTO HELECHOS	ACAGTG		34.7868
3	HCR	PROYECTO HELECHOS	CGATGT		33.0392

Tabla 3 Resumen de las muestras indicando el número de adaptador utilizando (Index Number) para cada muestra (Sample ID) y la secuencia de su respectivo adaptador (Index 1) con el porcentaje de reads atribuidos a cada uno de estos (% Reads Identified).

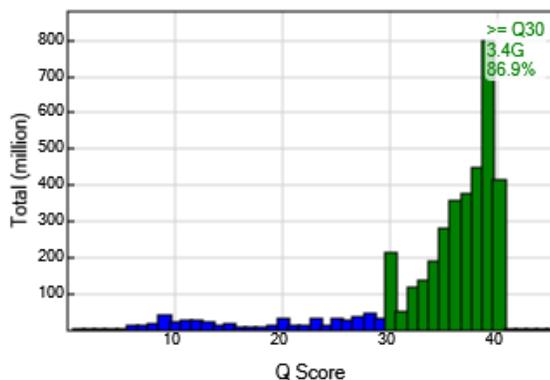


Figura 9 Distribución del valor Q en la secuenciación.

En la figura 7 se observa la distribución del valor de calidad Q de la secuenciación, indicando que un 86,9% de los datos presente un valor superior a 30 (certeza 99,9%).

5.3 Análisis bioinformático

5.3.1 Control de calidad.

Las muestras fueron filtradas eliminando de los archivos las secuencias que tuviesen menos de un 70% de bases con un valor de Q menor a 30, condición que cumplió aproximadamente un 87% de estas.

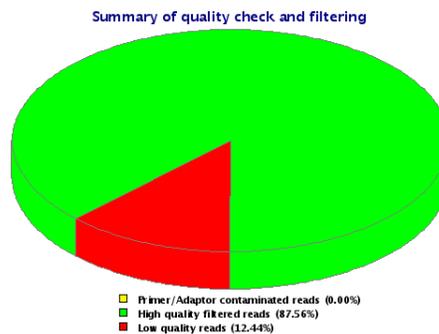


Figura 10 Resultados del filtro de calidad, en verde se ve la proporción de secuencias de buena calidad (~87%) y en rojo las secuencias de baja calidad descartadas (~13%)

5.3.2 Análisis estadístico: edgeR

El análisis estadístico mostró 3310 transcritos expresados diferencialmente entre los estados hidratado y desecado, y 2582 entre desecado y rehidratado.

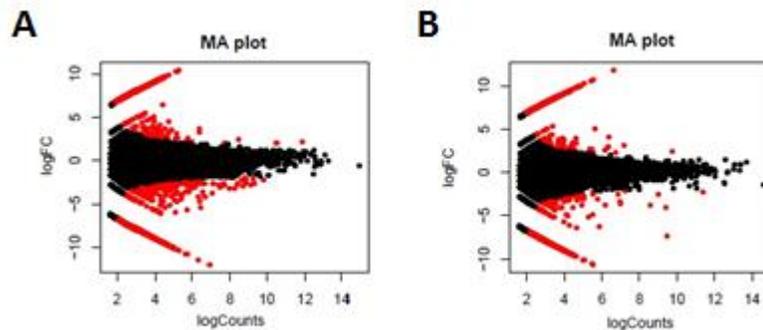


Figura 11 Representación de los genes expresados diferencialmente entre las condiciones Hidratado-Desecado (A.) y Desecado-Rehidratado (B.) en relación a su abundancia (logcounts) y variación (LogFC).

Se seleccionaron los transcritos que presentaran una mayor expresión diferencial entre los estados hidratado, desecado y rehidratado en *Hymenoglossum cruentum* ($P < 0,05$), obteniendo 297 candidatos de los cuales 34 fueron considerados de interés en base a su identificación y gran abundancia relativa presentada.

5.3.3 Análisis global del transcriptoma.

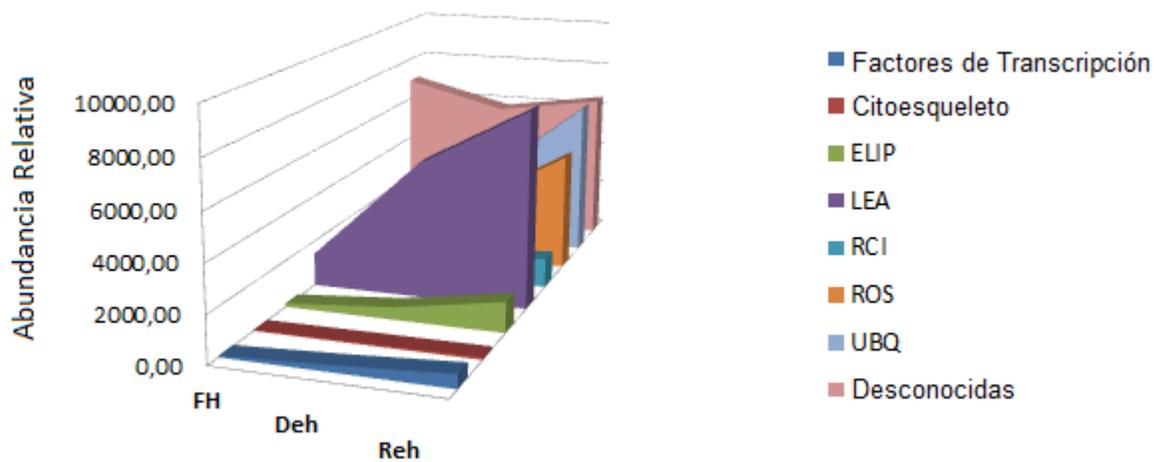


Figura 12 Variación de la abundancia relativa durante el ciclo de desecación-rehidratación, FH = Hidratado, Deh = Desecado y Reh = Rehidratado.

El análisis global del transcriptoma (Figura 11) muestra el gran aumento en la expresión de grupos de genes en relación a la expresión que poseían en estado hidratado. Destacando las proteínas hidrofílicas (LEA) y estrés oxidativo como moléculas protectoras, y la proteína de ubiquitinización participando como reparación para el recambio de proteínas mal plegadas.

En menor manera destacan las proteínas de unión a clorofila como agente protector disminuyendo la proporción de clorofila libre (Hutin C. *et al.*, 2003), y la presencia de péptidos hidrofóbicos con posibles roles en la estabilización de las membranas.

Las proteínas desconocidas varían su expresión en respuesta a estrés hídrico, pero dentro de su dinamismo a nivel de grupo solo poseen alta abundancia, sin variaciones significativas.

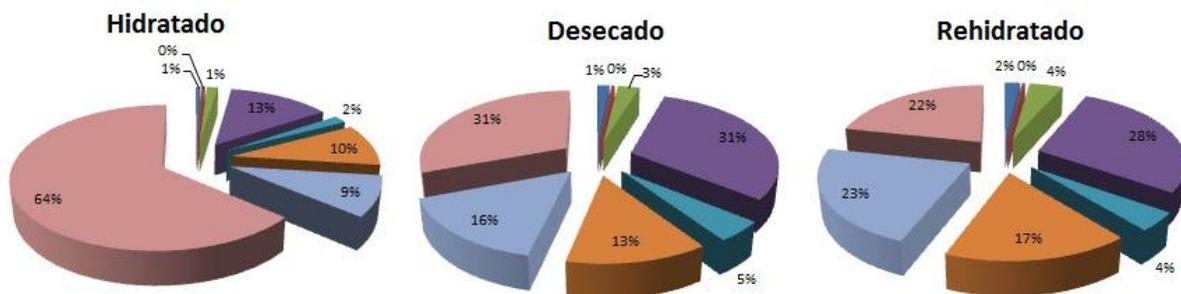


Figura 13 Variación del porcentaje de transcritos expresados durante el ciclo de desecación-dehidratación.

En la figura 12 se puede observar como aumenta la proporción de la expresión de proteínas LEA desde 13% a 31% en respuesta a la desecación y se mantiene en un 28% en la rehidratación, destacando su importancia como mecanismo de respuesta. También se ven aumentados los porcentajes de transcritos relacionados con estrés oxidativo y ubiquitinización indicando una función de detoxificación. El alto porcentaje de transcritos desconocidos se debe a baja homología de estas secuencias con otras disponibles en las bases de datos de proteínas (UniProt) y ARN (RFAM).

5.3.4 Grupos de genes.

Los genes fueron agrupados según función y/o familia de proteínas evaluar los diferentes tipos de respuesta durante la desecación.

- **Proteínas reguladoras.**

Se identificaron tres genes con respuesta a desecación con posible función reguladora

ID	ORF	Secuencia de aminoácidos
comp14833_c0_seq 3	-2	MVAPLCKPSSLKSSVSPSAQLHLHTRHQHRGVRRRSWGKVVSEIREPNKRSRIWLGSDTPDMAARA YDAATLCLRGPNAKFNFPDCLPVLPSVPVTPCKEIQRIAAAAAATARPVSPTRPGSPHPTLVFKEPIACE TVTTPPIWLEATDQCFNNRNSNFSNSLQSFQNCNGSGLNCDIDWMDLFRSHAPRSFQSMPLTCLDV
comp8097_c0_seq4	-1	MTLLSRRLSSDWWESLDALKSKLHYFLATATPDRDLSRLSDTLARYSSSLTVSSVPNAIDIVSGEYCS PFMSAFSWIGRWRPPTTVIGLVVYSSALRSDDGKANGPIMGQLATPIAPLSQSQRSLKDLRENIQAL ESNLSDELRLKLTGIADANMVKALDLGRGKMGVGEAMMNGQVRLDTKLTQLRLLSKADNLRVDSL SLFNLLTPVQAAYCVLASLNVAALRQFR
comp16233_c0_seq 1	+3	MANKHARPPSGVRSSSSSLPALAPSSQDQHELKPKNVNDSTSPASSPRNCKHPVYHGIRQRRW GKWVAEIRLPRNKARLWLGFSPPAMAARAYDVAALSLKGDQAQLNFPEYAHSLPHPLTSPRDIQIA AAAAAGAW

Tabla 4 Secuencias y ORF de proteínas reguladoras presentes durante el ciclo de desecación-rehidratación.

comp14833_c0_seq3 y comp16233_c0_seq1

Se identifican como proteínas DREB-like (AP2/ERF) con una cobertura de entre 10-16% pero con una similitud mayor al 70% con los dominios AP2, ERE y de unión al ADN, sugiriendo una función reguladora.

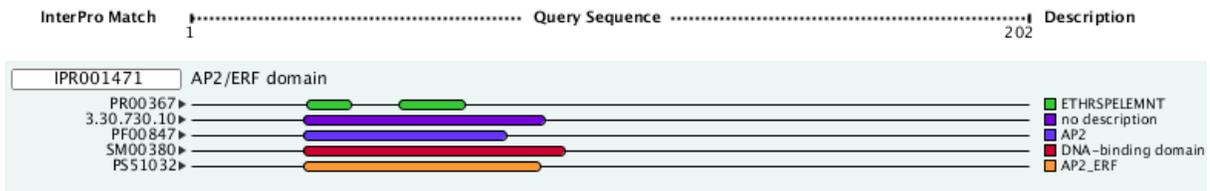


Figura 14 Resultado InterPro mostrando dominios encontrados en comp14833_c0_seq3.

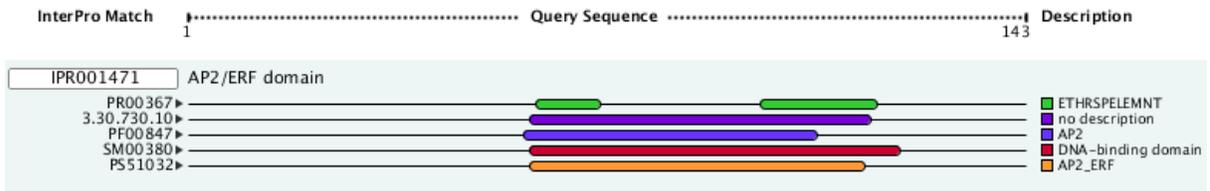


Figura 15 Resultado InterPro mostrando dominios encontrados en comp16233_c0_seq1.

comp8097_c0_seq4

Existen coincidencias con diversos factores de transcripción, pero con similitudes no superiores al 55%, en InterPro se identifican dominios DOG1 (Delay of Germination), gen el cual ha sido reportado específicamente en semillas y con función desconocida, pero posee un dominio ABRE (abscisic acid responsive element) sugiriendo una función relacionada con las rutas del ácido Abscísico (Bentsink L. *et al.*, 2006).

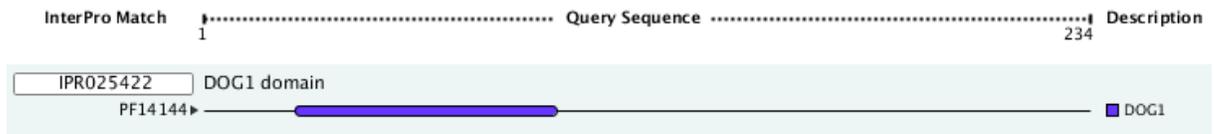


Figura 16 Resultado InterPro mostrando dominios encontrados en comp8097_c0_seq4.

Los resultados encontrados sobre la expresión de los genes DREB coinciden con la literatura al ser inducidos al ser sometidos a estrés hídrico y siendo encontrados principalmente durante y posterior a la desecación. Respecto a DOG1, esta proteína se ha reportado exclusivamente en semillas por lo que es difícil clasificar el rol que posee, pero dada su ausencia en la condición hidratada se asume que responde a la desecación activando la transcripción de proteínas de respuestas.

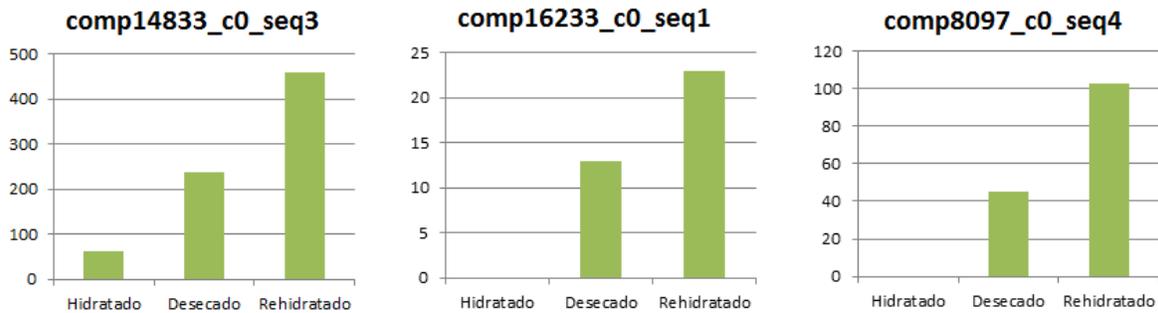


Figura 17 Abundancia relativa de los genes durante el ciclo de desecación-rehidratación (comp14833 y comp16233 = DREB-like; comp8097 = DOG1).

- **Proteínas del citoesqueleto.**

Experimentos de proteómica realizados en otras plantas de resurrección (*Physcomitrella patens*, Wang, X. *et al.*, 2009) han demostrado un reacondicionamiento coordinado en el citoesqueleto al variar la expresión de túbulina y actina. Sin embargo en *H. cruentum* no se encontró variación en estas proteínas, si no que en proteínas asociadas a la estabilidad del citoesqueleto (Formina y cadena ligera de la dineína).

ID	ORF	Secuencia de aminoácidos
Comp20880_c0_seq1	-3	MVWDKLRTGSFELNENEIQALFGFNLSKNRQPAGPSVPAKKGVLDSKKAQNIAIQLRALKVRTQD ICDALLEGDGLNIELLEVLVKMSPAQDEQKALLDFGGDESELGPAERFLKAVLQVPNAFQRLEAMKFK ASIKDDLQVQESLQTLAACREVRNRLFLKLEAVLKTGNRMNKGTRNGEAEAFKLDTLKLSDVKS ADGKTTLLHFVVEEIIKAEGLRAFRAENSEGSSANMPTTAPGLESQKSEELKRRGLDVLVGLCTELENV RKASGMDADALNQSVLKLASGLSIQGRKTSFQVQAHTSGVFPTEDSFCKNMEQFCSQAEDNVLRS KEELDRVFDLVKQSASYFHGNLRETQPLRLFMIVNDFRSMLEKVCRD LAKPLKMKTRG
Comp13913_c0_seq1	-3	MLEGKAVVGETDMPILMQQHAMRCASQALDLHDLGDCQEIARFMKQEFDKCYGGGWQCVCVGTG FGSFVTHTHGNFIYFCLEKLAFLFKGIPACGFT

Tabla 5 Secuencias y ORF de proteínas asociadas al citoesqueleto durante el ciclo de desecación-rehidratación.

Los resultados concuerdan con los datos experimentales obtenidos a través de estudios de proteómica en plantas de resurrección (*Physcomitrella patens*, Wang X., 2009) en donde se observó un reacondicionamiento del citoesqueleto durante la desecación. Destacando el desensamblaje de los microtúbulos, que en *H. cruentum* se obtendría mediante la disminución de la proteína (DLC1) una de las encargadas de conferir la estabilidad (Asthana J. *et al.*, 2012) y la expresión de formina durante la rehidratación, promoviendo la nucleación de los filamentos de actina. No se encontraron variaciones en las proteínas túbulina y actina, manteniendo su nivel de expresión durante el ciclo de desecación rehidratación, sugiriendo un mecanismo centrado en la polimerización y despolimerización en vez de la síntesis de los componentes, concordando con la rápida velocidad de rehidratación.

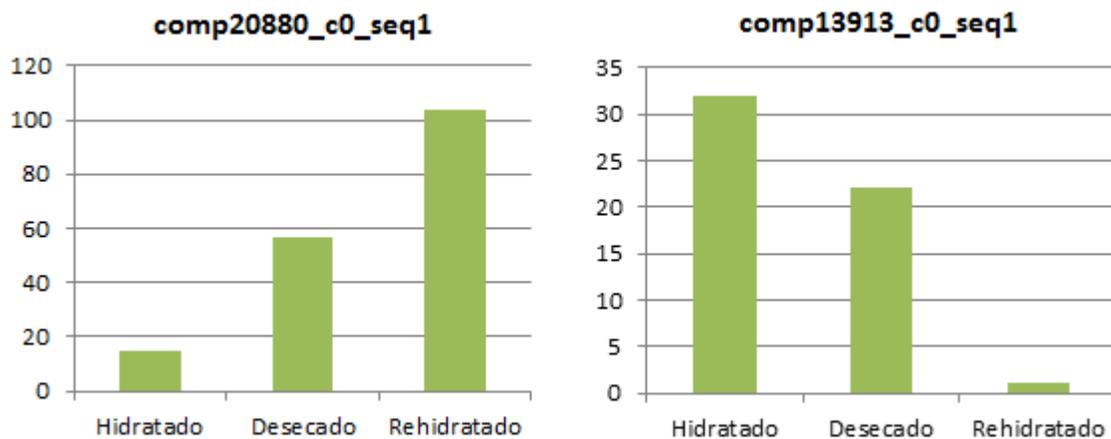


Figura 20 Abundancia relativa de los genes del citoesqueleto durante el ciclo de desecación-rehidratación. Comp20880_c0_seq1 = Dynein Light Chain 1, comp13913_c0_seq1 = Formin-like protein.

- **Fotosíntesis**

Se encontraron tres proteínas con dominios de unión a clorofila a/b que aumentaron su expresión durante la desecación y rehidratación. De estas proteínas se identificaron dos (comp19765_c0_seq1 y comp12199_c0_seq1) como LHC (light harvest complex) y una en mayor abundancia como ELIP (Early light inducible protein).

ID	ORF	Secuencia de aminoácidos
comp19765_c0_seq1	+3	MAALGAVAVCSSSIAGQTCLRPASNEVARKAGLDGVDYSRITMRKSVSKSSTSSFWYGPDRPKFLGP FSADTPSYLTGEYPGDYGWDTAGLSADPETFSRNRQLEVIHARWALLGLTGLIVTPEILAKNGVPIKEPI WFKAGAQIFSEGGLDYLGNPSLIHAQSILATLAVQVVLLGAVEGYRVAGGPLGEVIDPLYGGAFDPL GLADDPESFAELKVKEIKNGRLAMFAAFGFFVQAIVTGKGP IQNLEDHLADPAKNNAWAYATNFVPG Q-IIRSMFLEFDELNLWKEFSMKW
comp12199_c0_seq1	+1	MVSAAVSHMSASRVVAVFQAASLLSRPRDVFSSSYFAAPLRVPGPVGRSLVVRCDTGEGNRSPLAAV QKSSPSLTGIQEAVDKSTKEGITRRDIERNQAETTSEKRSFLGTQPASTMPWPRPEVERRPETGDRSLG SIFAVDGAAPETINGRMAM***
comp16196_c0_seq2	+3	MAATSSVMSAAGAIVASSMLTSRPAFESSPCAHAALMRLPGISRGLVVRCDAGKGGKPLETIQKSSP SLTGIQDAVDKSTKKELSKSDIERHQAETTSEQQSAFGARPTSTVPWPRPEIERRPETGDRSLGSIFAFD GAAPETINGRMAMVGFVWALVAEKLTFVIEQLFNPATTTGLLFFGAVVQLFTVASVPLVSGESTDA RQWGPFFNAKERWNGRLAMMGFAALVLYEVIRQAPLIH

Tabla 6 Lista de genes con dominio de unión a clorofila presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

comp19765_c0_seq1 y comp12199_c0_seq1

Las secuencias presentan una similitud con proteínas LHC (light harvest complex) de 84 y 73 por ciento respectivamente, presentan un dominio de unión a clorofila a excepción de comp12199_c0_seq1 donde no se visualiza el dominio al ser un fragmento N-terminal de la proteína, sin embargo se asume el rol al poseer alta similitud con LHC.

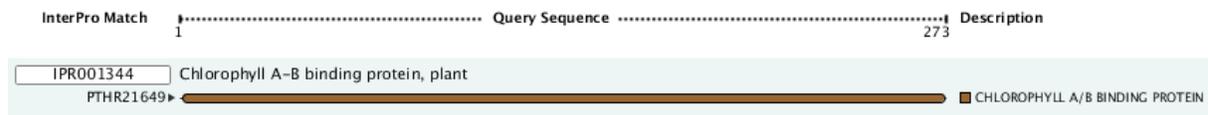


Figura 21 Resultado InterPro mostrando dominios de comp19765_c0_seq1.

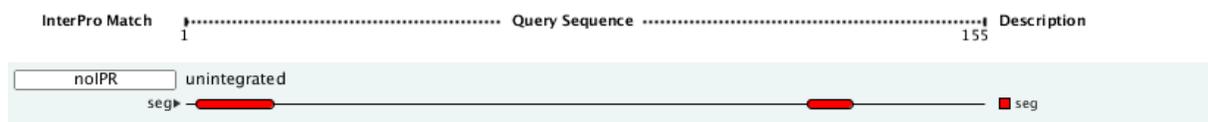


Figura 22 Resultado InterPro mostrando dominios de comp12199_c0_seq1.

comp16196_c0_seq2

También posee dominios de unión a clorofila y una alta similitud con LHC (66%), pero un mayor porcentaje de similitud con ELIP (78%), destaca la abundancia de esta proteína siendo

mucho más alta que las proteínas LHC encontradas, pero manteniendo el mismo patrón ascendente de expresión. Esta proteína se encarga de proteger contra el daño foto oxidativo presente durante la desecación-rehidratación.

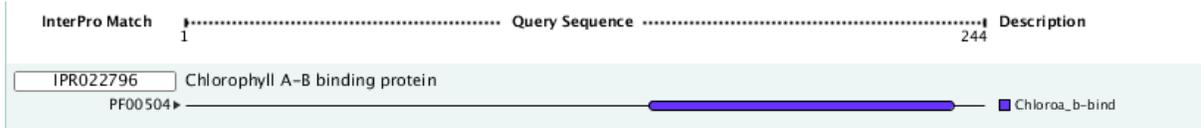


Figura 23 Resultado InterPro mostrando dominios de comp16196_c0_seq2.

La expresión de estos genes en respuesta al estrés hídrico concuerda con lo visto en otras plantas de resurrección como *Craterostigma plantagineum* (Alamillo J. y Bartels D., 2001) y *Sporobolus stapfianus* (Neale A.D. et al., 2000) en donde no presentan una expresión significativa en estado hidratado, sin embargo, destacan presentan altos niveles de expresión durante la desecación-rehidratación.

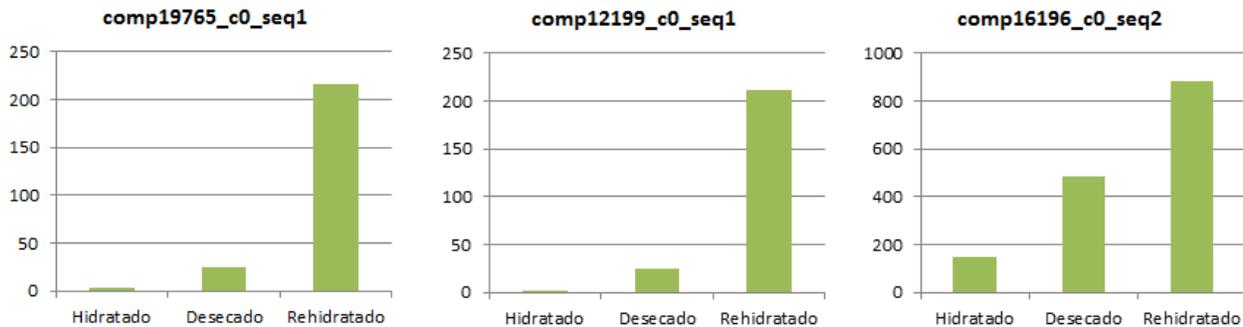


Figura 24 Abundancia relativa de los genes relacionados con la fotosíntesis durante el ciclo de desecación-rehidratación. comp19765_c0_seq1/comp12199_c0_seq1 = LHC y comp16196_c0_seq2 = ELIP

- **Proteínas hidrofílicas.**

Coincidente con la literatura se encontraron tres proteínas altamente hidrofílicas en respuesta a estrés hídrico, mostrando un gran incremento en su expresión durante la desecación-rehidratación, sugiriendo una participación importante en la tolerancia a la

deseccación mediante la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares con el que se estabilizan proteínas y componentes celulares (Reyes J. *et al.*, 2005; Goyal K. *et al.*, 2005).

ID	ORF	Secuencia de aminoácidos
comp14632_c0_seq1	-2	MADQTSEVYVDPINTPIDPALADKIKKDKRNEHLGEMGAAAAGAYGLYEHHEGKKDPENAHHRHKIEQEL AAAAGLGAGGGALYEHHEGKKAKEGMGN
comp4045_c0_seq1	+1	MQTAKKTAATAKEKVANVTAKAEKMEKGHASTQEKLDKTMAHDKTGKAAAHENKHAKEAAAEQAT HEKTAQNKVGAAMKDDIHMQRPPPSVADTAAANVPPP
comp12617_c0_seq3	-1	MANIMNKVEEKLHMGGHKKEEPAVAAGQTPVTEYGQAQTPVTGYGQTQQMPYDGKTDLHGQTA PHESTMdkvkntvktkkGGRGKSGDGSSSDSD
comp4047_c0_seq1	-2	MANIMDKVGEKLMGGHKKEEPA***

Tabla 7. Lista de proteínas hidrofílicas presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

comp14632_c0_seq1

Se observó una homología superior al 82% con la proteína ASR1 (Abscisic Stress-Ripening) la cual pertenece al grupo 7 de las proteínas LEA, y comparte las mismas propiedades fisicoquímicas que el resto de proteínas LEA. Siendo pequeñas, estables al calor y con una estructura altamente dinámica (Frankel N. *et al.*, 2006; Goldgur Y. *et al.*, 2007). Estas proteínas además se inducen al ser sometidas a estreses abióticos (Doczi R. *et al.*, 2005), es por ello que diversos estudios las han propuesto como candidatas para la tolerancia al estrés hídrico y salino, al observarse un incremento en la tolerancia al ser sobre expresadas (Yang et al 2005; Jeanneau 2002).



Figura 25 Resultado InterPro mostrando dominios de comp14632_c0_seq1.

comp4045_c0_seq1

Esta secuencia no presentaba homología significativa en la base de datos *nr* de GenBank, siendo necesaria la traducción de sus marcos de lectura para analizar los dominios conservados, en donde se clasificó como LEA-D113, perteneciente al grupo 4 de las proteínas LEA, y en base a su tamaño (80-124 aa) se pueden clasificar como LEA 4A (Battaglia M. *et al.*, 2008).

Al igual que otros grupos estas proteínas están encargadas de la estabilización intracelular, este grupo en particular por lo que su presencia y sobre expresión provoca una tolerancia a la desecación.

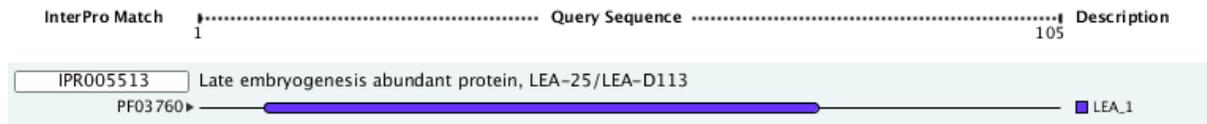


Figura 26 Resultado InterPro mostrando dominios de comp4045_c0_seq1.

comp12617_c0_seq3 y comp4047_c0_seq1

Con similitudes superiores al 80% se identifican como Dehidrinas, pertenecientes al grupo 2 de las proteínas LEA, siendo altamente hidrofílicas con un gran contenido de aminoácidos polares y cargados. Esta proteína posee una estructura altamente inestable que no puede ser ordenada con temperatura, ni con sales estabilizantes (Mouillon *et al.*, 2006).

InterPro no encuentra sitios atribuidos a proteínas LEA, sin embargo presentan una alta similitud con el extremo N-terminal de estas (80%), por lo que se asume su identidad como proteínas LEA grupo 2.

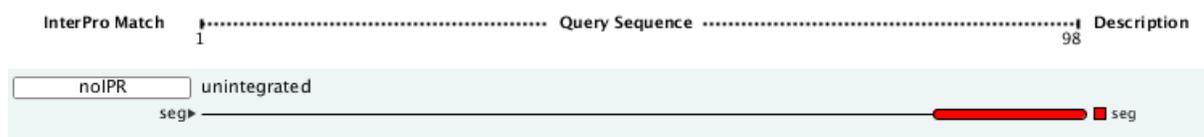


Figura 27 Resultado InterPro mostrando dominios de comp12617_c0_seq3

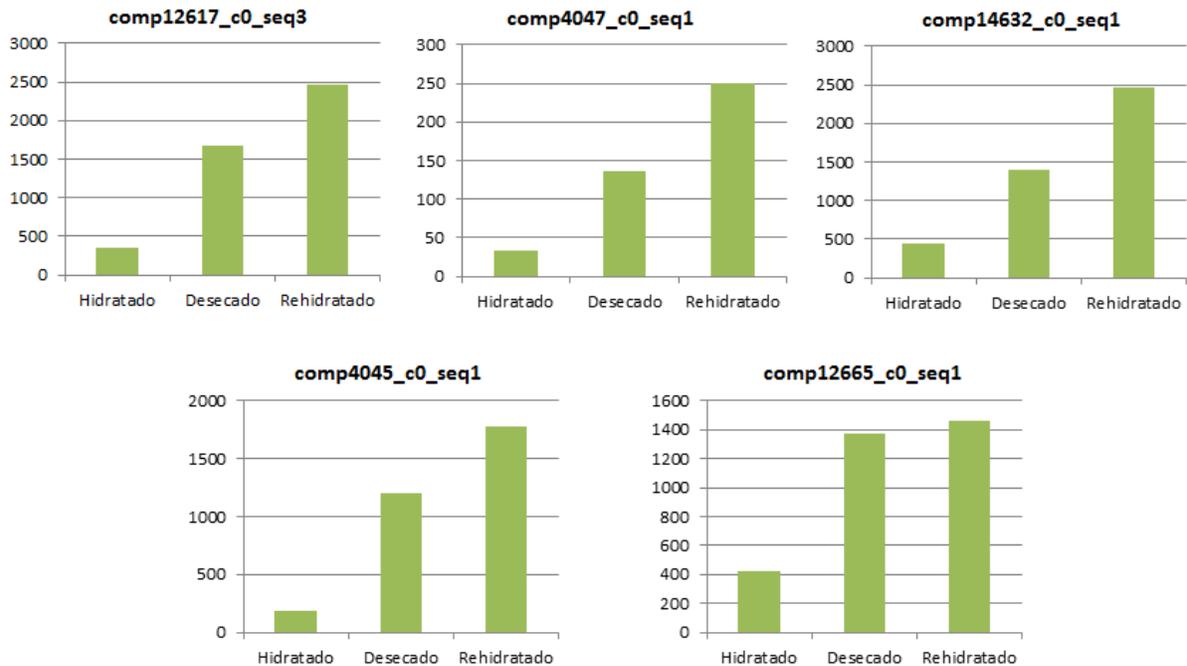


Figura 28 Abundancia relativa de proteínas hidrofílicas durante el ciclo de desecación-rehidratación. comp12617_c0_seq3/comp4740_c0_seq1 = LEA grupo 2 (Dehidrinas), comp14632_c0_seq1 = LEA grupo 7 (ASR1) y comp4045_c0_seq1 = LEA grupo 4A (LEA-D113).

- **Proteínas Hidrofóbicas.**

Se encontraron dos proteínas con similitud sobre el 90 por ciento a RCI (Rare Cold-Inducible), las cuales son proteínas hidrofóbicas expresadas en condiciones de estrés abiótico.

ID	ORF	Secuencia de aminoácidos
comp17425_c0_seq1	-3	MGSATVVEVILAILLPLGVFLRFGCAAQFWICLLLTILGYLPGIYYLVLVG

Tabla 7 Proteínas hidrofóbicas RCI (Rare Cold Inducible) presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

comp17425_c0_seq1 y comp4740_c0_seq1

Son proteínas a las que se les han atribuidos roles de estabilización de las membranas en condiciones de estrés (Medina J. *et al.*, 2007). Se sobre expresan en diferentes condiciones de estrés abiótico, pero destaca su sobre expresión en condiciones de bajas temperaturas y desecación (Chang-Qing, Z., 2008). Experimentos citológicos la sitúan en la membrana plasmática, información que concuerda con los dominios transmembrana que presenta su secuencia de aminoácidos. Esta característica sugiere una función mecánica en estabilización de las membranas durante la desecación.

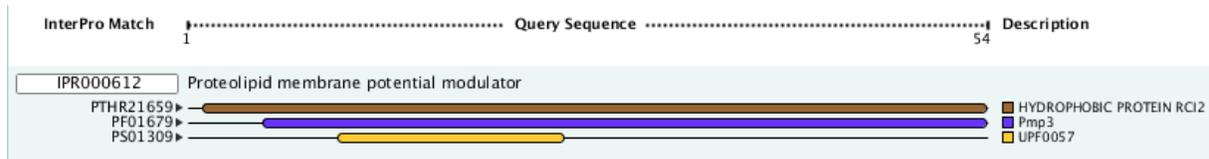


Figura 29 Dominios encontrados en InterPro para ambas proteínas.

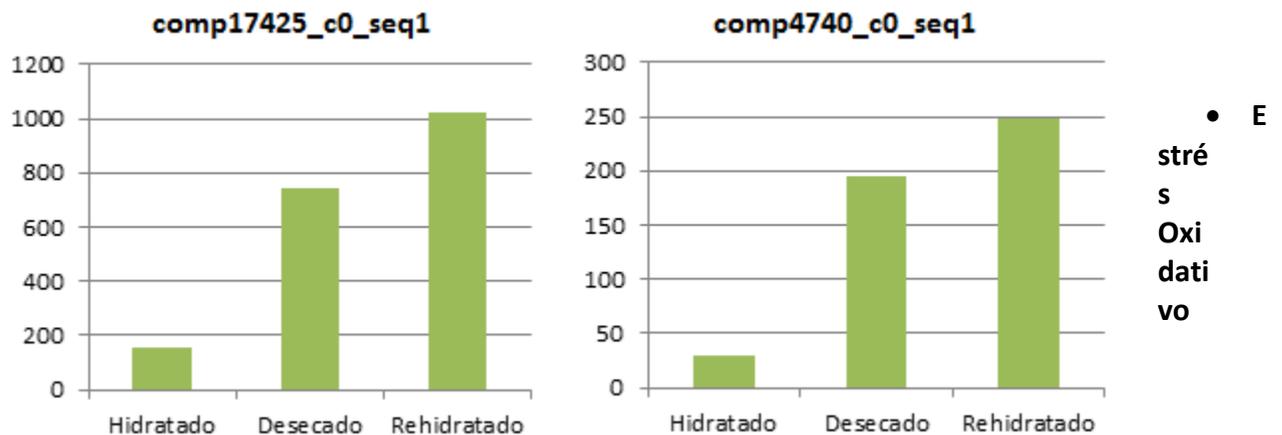
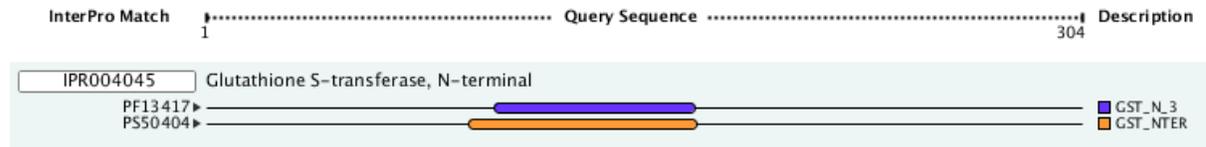


Figura 30 Abundancia relativa de los péptidos hidrofóbicos durante el ciclo de desecación-rehidratación.
comp17425_c0_seq1/comp4740_c0_seq1 = RCI.

ID	ORF	Secuencia de aminoácidos
comp16033_c0_seq1	+3	MHCVLRILPPAAVASSSTPSAIFTGKILPAFPALFPATSNQLPSPSSVAARRTPALSVPSARLNNMAAAV HATRGAVDLEAFGKAASGSGTPSKQRGDCPFQRIYLGLEEKGIPYATATYIEEGDNKPSWFMEKNPSGLIP VLRDGDWTIQDSEKIAQHLLEKFPPEPSLKTTPHLLKEVGIFFAFTSWLKSAYSYPEKDEFVKELKAFDEH LKSHGPFIAAGKPTDSDALAPKLRHARVALDHFMDFKIVDEFAAVKTYMQIESRPSFQKTDSPDGMII QGWWQKFKQLPDKIAQPQEV
comp17416_c0_seq1	-3	MALRVSPAVPLRTLLEASPFLPRVAGNVLSGARQWSRLQVRAKESLELDSKPLTGVVFEFTEVQSHVTKI ASSNKESLARQRYRPSCEAAINDQINVEYVNSYIYHALYSYFDRDNVALPGFAMFYKEASAEERGHAEAFI KYQNLRRGGQVKLQAIIPPEMFEFNHSEKGDALYAMELALSMEKLTNEKLLNLSKVAEENNDPQMSDFVD DFLTDQVEAIRTVSGYVSLRRRIGEGHGVYHFDLELQKKGPAAVAA
comp18195_c0_seq1	+3	MDPYKYRPSNYSNPFLLTNAGAPVWVNDNSSLTVGSRGPILLEDYHLVEKLAHFERERIPERVVHARGAS AKGFFEVTVDVSHLTCADFLRSPGVKTLIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNFDIVGNFFPV FFIRDGIKFPDVIHAFKPNPKSNIQEMWRILDYLSHHPESLHTFMFFFDVVGIPINRHMEGFGVHTYVLL NKAGKSTYVFKHWKPTCGVKCLSVEEAIIVGGTNSHATQDLYDTIAAGNYPEWTLHIQTMNPDEDEDK FDFDPLDTSKTWPEDIFLQPVGRLVLNKNIDNFFAENEMLAFNPALVVPGIHYSDDKMFQARLFAYSOT QRHRLGPNYLMLPVNAPKCAFFNNHYDGFMMFMHRDEEVNYPFRDVPVRAERVPISRVLTGARKK VLIEKQNDFIQPGVRYRSWAPDRQERHIKLWIEALSDPKVTYELRSIWISYLSQCDKSLGQKVSARLNMRS HI
comp17594_c0_seq1	-1	MHLSLLSSPRLISTSSSLFASPHPSLASTTSRGAPFRTAFACSNSSPSSGSPDDVMATGAKVYQNIKNAVSA NGSATEQAVTKGTHGKPLYTTLGLPVTDDNNSLTLGETGTLFEDLHMFQAHFNRERIPERVVHAKG AGAHGYFEVTKDVSCLCKAKFLNTVGGKTPIFSRFSTVSGESGYPDARDPRGFSVKFYTEEENWDMVG NNTPIFFIRDALKFPDFIHSQKRNQTHMKDPNAFWDFLSLVPESLHQVLILFSPRGVDPGFRHMNGYGS HTFKWVNAEGKAHWVFKHFKTDQGIKNLTHEEAIKAGINPDYAIEDLFSNIEKGSFSPSWTFSVQVMPL DAATYKWDPDFDLTKVWPHKDYPLREVGLVLRNRPNTNYFAEVEQASFSAPAHMVAGIEASPDRLQARL FTYDDTARYRLGTNYLQIPINRCFKAQTYTSDGSMVTANGANKPNYPNSYEDMPRPDPAQLDVPY KHEGGVSRFPPRKWQEQDDYDQPRALWLKLEEDKEQTVKNIAGHIKGAEEFIVKRQLGVFRKCDPEIA AKIEQAMEMKEKQPEPYSMVA
comp15430_c0_seq1	+2	MRCFLLCMLASPLASCQLTSDFYATTCPTLQSVVSSGVETAVQAHSSRMAASLLRLHFHDFVNGCD GSVLLDGRSGEKHASPNGSLRGFHVDDIKAIVESACKATVSCADILALAARDSVVLVGGPSWTVLLG RRDSTTANQSAANSALPSPSDPLSTIESKFRAVGLTNEVPLVLSGAHTIGRSRCRFLATRLYNFSGTGQPD PTIDSAYLQKLQSSCPQGEDPHALVPLDPATKNSFDNYYLNLQNNRGLLHSDQQLLSTSGADTISYVNT FASDQGTFFTSFMASMI SMGNISPLTGTGDIRLNCRVANS
comp18775_c0_seq1	-3	MGTPVKDLRSKAELDKILSQGGIVLHFWASWCAASAQMDAVFAQLCSDHPRARFFRVEAEETPEISEA YEVSAPFVVCIKDGGVVDKLEGADPAELANKVARLASPPGLSKESAPVSLGMDAGSIKQEIQQNLDKER TDGPNVTHLSEITREPVLANGTKVAEPLENGEDSRSLQNLVASKPIMLFMKGTPPEPRCGFSRRVVEI LKEIGVEFGTFDILGDEDEVQRGLKFSFNWPTYQLYTVGEFIGGCDIVTEMHKGGELKEVLAEKGLLLPME SMESKVKLIYTSPTMLFMKGTDPAPRCGFSKVVNALKEEGISFGSDILSDDEVQRGLKTFSNWPTYQ LYHSGELIGGCDIILEMKASGELKSTLS

Tabla 8 Proteínas relacionadas con estrés oxidativo presentes en el ciclo de desecación-rehidratación.

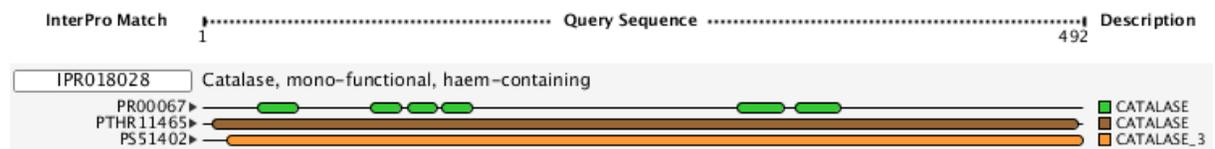
comp16033_c0_seq1



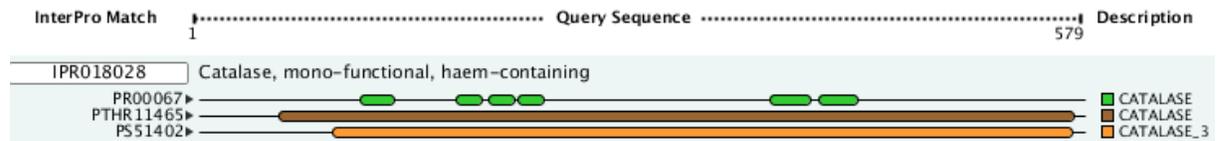
comp17416_c0_seq1



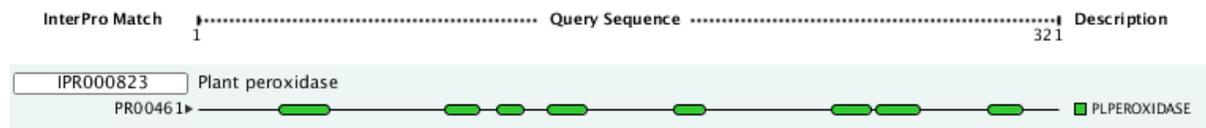
comp18195_c0_seq1



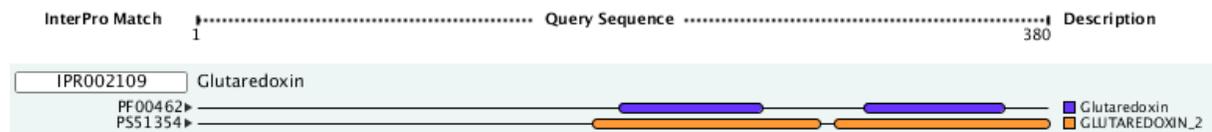
comp17594_c0_seq1



comp15430_c0_seq1



comp18775_c0_seq1



Se observa una expresión abundante de Ferritina (comp17416_c0_seq1), glutatión S-transferasa (comp16033_c0_seq1) y catalasa (comp17594_c0_seq1) durante la desecación y rehidratación, esta sobre expresión que potencia la maquinaria antioxidante es un mecanismo importante para reducir el daño oxidativo inducido por la desecación. Pudiendo este mecanismo antioxidante conferir tolerancia a la desecación (Badawi G.H. *et al.*, 2004; Wang F. *et al.*, 2005).

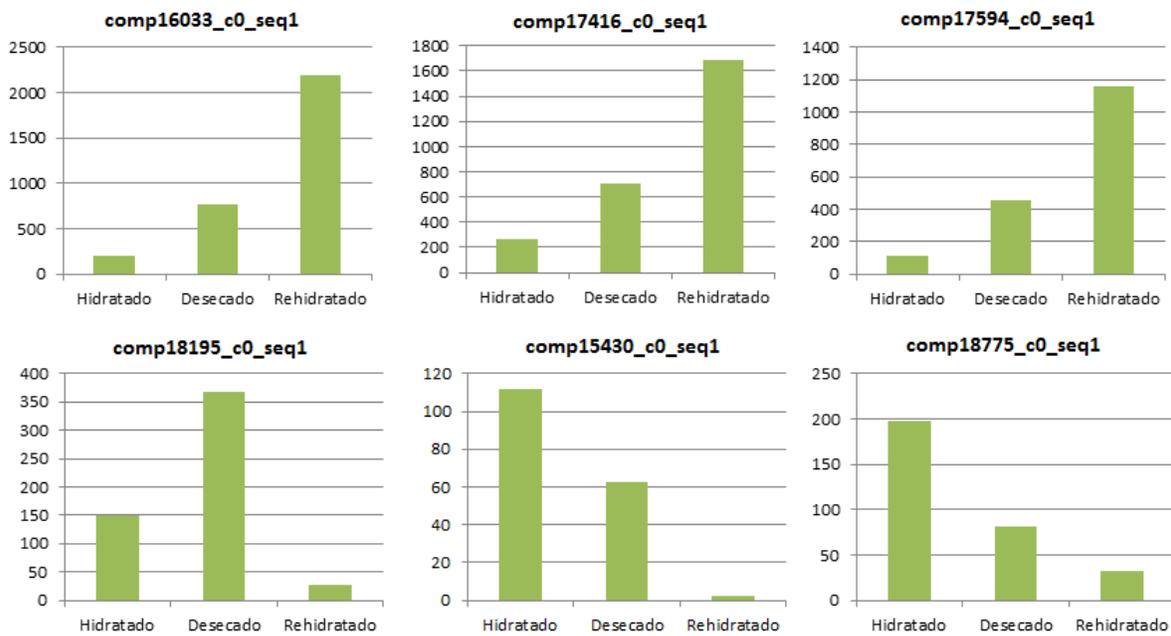


Figura 31 Abundancia relativa de los genes durante el ciclo de desecación-rehidratación. comp16033_c0_seq1 = Glutathione-S-transferase, comp17416_c0_seq1 = Ferritin, comp18195_c0_seq1 =Catalase, comp17594_c0_seq1 = Catalase, comp15430_c0_seq1 = Peroxidase y comp18775_c0_seq1 = Glutaredoxin.

- Otras proteínas y desconocidas.

ID	ORF	Secuencia de aminoácidos
comp16047_c0_seq2		MALVFKIKFQDTRLRRVWVTDRIEADNIPSLQQLEAKIRDLFQLSPTTAIVITYIDKEEDVVTLAEDQDLVD ACIGQGLNPLRLDVKSPKESETRREPSNASAPSSSAESPLDLNVETFLKGIFPQATADAINQFLSKLPQVD PKLPAALLFRNAQAFNEFMKTLTRESKCARRWAGRSSSENANRNPYEHPHADQSDPQRFPFPGGRGAS AGLFHRGVQCDGCGKSPIEGPRFKSKKVHNYDLCSCEFETMGNEIDYDKIDHPFQPPHHGFHNHSHLGR GRRQHMGPPFRPFARGPYGWKPECFRMPGPNISAPAGAVGGKLDARFVKDVTIFDGTLELPSTRF TKIWRLSNIGTIPWPQNTQLMHIGGDMLSSEEVVNLELPEGGLPCGEEVEASADLVAPEKAGRYVSYWR LMSPSGQKFGHRVWAVIQVVPQGEQSPQLYESLRGEEPTPEVEQAEMVIEKGNEEYASDSKGKEEMVS LQRREAMIPDVTVVDSGKRVDVEIAENDMKEKLDMMKVPDQRSNTDSPTDQTHVTDSDANLGLKRTM NSDELDFGFSVVEKPVENTEEDVTEKTDHEKHLQLLERMGYDRQLNVELLQKNNQNLTLVGDLVATA GWDDMLNDLQEMGFDRQTNRRLLIKNEGSIKRVVKDLVEMEMQKVGQNRKDAVPLEANKV
comp16774_c0_seq1	-2	MEFTAKSFLAFLCFLASSVHAAPCPDVLGSLTSACKQYVVGATPPAPASNGPCCNLKIPISVPCLCSSIPA DAFQVINKKAVSTLISTCGVTIPPGTSCGGL

Tabla 9 Genes presentes sin función esclarecida con variación significativa en el ciclo de desecación-rehidratación.

comp16047_c0_seq2

La secuencia presenta una similitud de alrededor de 50% con *Ubiquitin-associated /TS-N domain*, pudiendo ser encargada de la ubiquitinización de proteínas mal plegadas y participar en el recambio proteico, se ve fuertemente inducida durante la desecación y rehidratación, por lo que se sugiere un rol reparatorio post desecación.

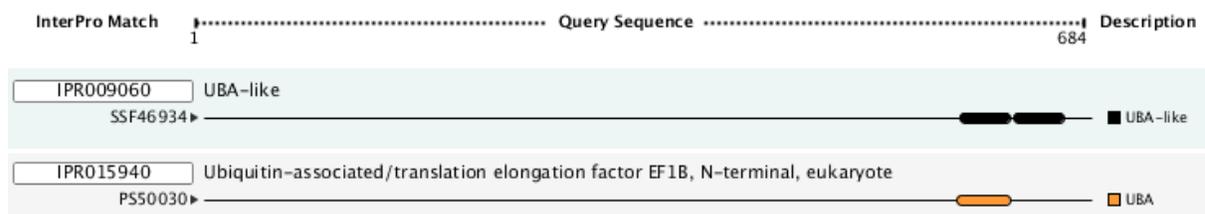


Figura 32 Dominios encontrados por InterPro en comp16047_c0_seq2.

comp16774_c0_seq1

Posee una similitud de alrededor del 50% con proteínas transportadoras de lípidos, estas proteínas participan en la transferencia de lípidos entre membranas y pueden unirse a las

cadenas acilo, además pueden encontrarse asociadas parcialmente a membranas (Kader J.C., 1996).

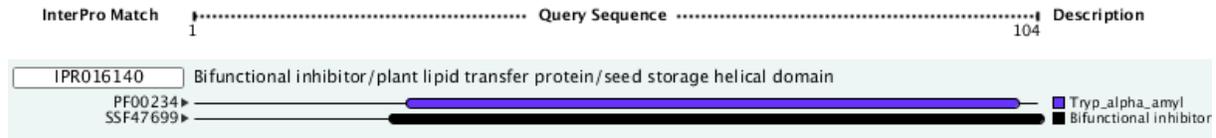


Figura 33 Dominios encontrados por InterPro en comp16774_c0_seq1.

El nivel de variación en respuesta a la desecación las convierte en proteínas de interés, sin embargo ha sido difícil relacionar el comportamiento de su expresión con mecanismos definidos de tolerancia a estrés hídrico.

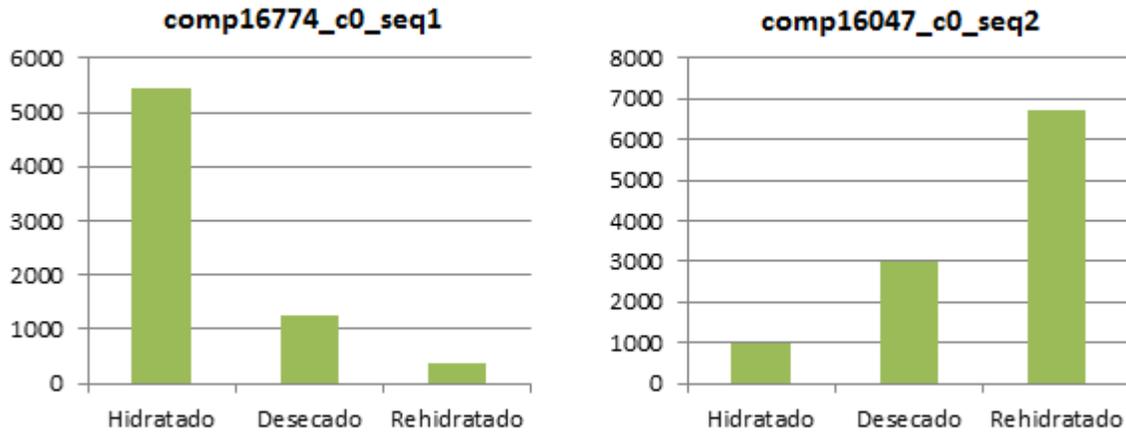


Figura 34 Abundancia relativa de los genes LTP (Lipid Transfer Protein, comp16774_c0_seq1) y UBQ (Ubiquitin-associated/TS-N domain, comp16047_c0_seq2).

- **Desconocidos**

También se encontró un grupo de genes que presentan gran abundancia en el transcriptoma, además de variación significativa durante el ciclo de desecación-rehidratación, sin embargo su identificación mediante la búsqueda en las bases de datos públicas no fue exitosa, requiriendo análisis más complejos sobre la estructura de las secuencias para poder inferir un rol hipotético.

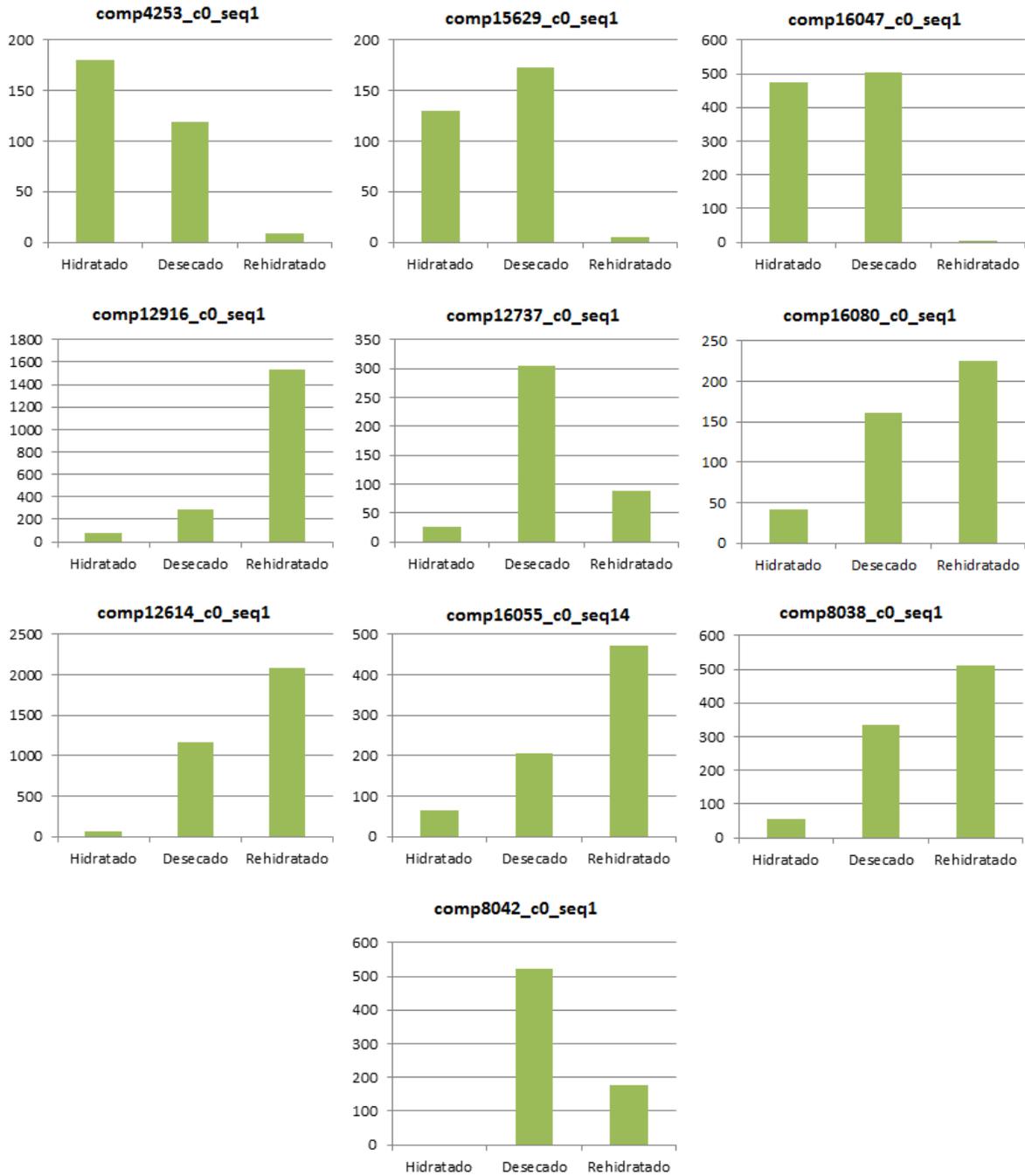


Figura 35 Abundancia relativa de los genes desconocidos durante el ciclo de desecación-rehidratación.

6. CONCLUSIONES

En el transcriptoma de *Hymenoglossum cruentum* sometido a un ciclo de desecación-rehidratación, se encontró que aproximadamente un 7% de los transcritos totales variaban durante el ciclo. De los genes que se analizaron, no se encontraron genes únicos pertenecientes a alguna de las etapas del ciclo, ya que la gran mayoría se expresaba dinámicamente durante este. De los genes con mayor dinamismo se encontraron mecanismos de respuesta ya descritos en otras especies, sin embargo queda por caracterizar en profundidad las proteínas desconocidas que presentan dominios interesantes, tales como el dominio de unión a ARN presentado por el transcrito comp12614_c0_seq1, que pudiese encargarse de la protección de los mensajeros durante los periodos de desecación. Así como además transcritos con presencia casi exclusiva en estado desecado como el comp8042_c0_seq1. El que aparecer en respuesta a la desecación, pero no se ha podido determinar sitios conservados, dominios, ni similitudes con proteínas ya existentes en las bases de datos públicas, siendo exclusivo de la especie.

La identificación de los transcritos más dinámicos durante el ciclo de desecación-rehidratación mostró mecanismos previamente descritos en otras plantas de resurrección y musgos. El más destacado fue la presencia de las proteínas hidrofílicas de los grupos LEA (LEA-D113, Dehidrinas y ASR1), este mecanismo es el que presenta una mayor respuesta al incrementar la abundancia relativa de sus transcritos en más de 5 veces, abarcando aproximadamente un 31% de la abundancia durante la desecación. Otras proteínas con función estabilizadoras que duplicaron su abundancia relativa fueron los transcritos de proteínas con carácter hidrofóbico y similitud a RCI, que se han descrito con función estabilizadora de membranas. Ambos grupos suman gran importancia en la respuesta de *Hymenoglossum cruentum* a la desecación dada su función y abundancia, sugiriendo la estabilización de los componentes celulares como uno de los principales mecanismos por los cuales *H. cruentum* tolera la desecación.

Otros grupos interesantes de proteínas son las encargadas de la detoxificación celular, el primero en respuesta al estrés oxidativo estos transcritos aumentan su abundancia, siendo importantes para disminuir el daño oxidativo provocado por la desecación. Se encuentran más expresados durante la rehidratación, y su abundancia se incrementa constantemente durante el ciclo de desecación-rehidratación. El segundo grupo corresponde a proteínas ELIP, encargadas de mantener niveles bajos de clorofila libre, evitando la formación de tripletes de clorofila los cuales tienen un carácter tóxico, y de esa forma reducir el daño foto oxidativo en *H. cruentum*.

Si bien la identificación de los mecanismos anteriormente descritos, entregan una respuesta parcial sobre lo que ocurre en *H. cruentum* durante el ciclo de desecación y rehidratación, aún queda un gran número de transcritos por identificar, siendo las “desconocidas” las de mayor interés dada la abundancia que presentan. Sin embargo, para comprender más plenamente los mecanismos utilizados por *H. cruentum* es necesaria una aproximación más sistémica en la que se identifiquen los transcritos con expresión constitutivas, los cuales también podrían aportar a la tolerancia a la desecación.

LITERATURA CITADA

- Alamillo J. y Bartels D.** 2001. Effects of desiccation on photosynthesis pigments and the ELIP-like dsp 22 protein complexes in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant science*. 160: 1161–1170.
- Alpert P.** 2000. The discovery, scope and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology*. 151:5-17.
- Apel K. y Hirt H.** 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399
- Asada K.** 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141:391–396.
- Asthana J., Kuchibhatla A., Jana S. C., Ray K., y Panda D.** 2012. Dynein light chain 1 (LC8) association enhances microtubule stability and promotes microtubule bundling. *The Journal of biological chemistry*, 287:40793–40805.
- Badawi G.H., Kawano N., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kubo A. y Tanaka K.** 2004. Overexpression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiol Plant* 121: 231–238.
- Baier M. y Dietz K.J.** 2005. Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of experimental botany*. 56:1449-1462.
- Bartels D. y Salamini F.** 2001. Dessiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology*. 127:1346-1353.
- Bartels D.** 2005. Desiccation Tolerance Studied in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *Integrative and comparative biology*. 45: 696–701.
- Bartels D. y Hussain S.** 2011. Resurrection plants: physiology and molecular biology. En *Plant desiccation tolerance*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Alemania. pp: 339-364.

- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos, F. y Covarrubias A.** 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology*, 148:6–24.
- Bentsink L., Jowett J., Hanhart C.J., y Koornneef, M.** 2006. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:17042-17047.
- Bernacchia G., Salamini F. y Bartels D.** 1996. Molecular characterization of the rehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Physiology* 111:1043-1050.
- Brini F., Hanin M., Lumbreras V., Amara I., Khoudi H., Hassairi A., Páges M y Masmoudi, K.** 2007. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*. 26:2017–2026.
- Bowler C., Montagu M. y Inze D.** 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology*. 43:83–116.
- Buitink J. y Leprince O.** 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* 48:215–228.
- Chang-Qing Z., Shunsaku N., Shenkui L. y Tetsuo T.** 2008. Characterization of two plasma membrane protein 3 genes (PutPMP3) from the alkali grass, *Puccinellia tenuiflora*, and functional comparison of the rice homologues, OsLti6a/b from rice. *BMB reports* 41:448–554.
- Chen T.H. y Murata N.** 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5:250–257.
- Collett H., Shen A., Gardner M., Farrant J. M., Denby K. J., y Illing N.** 2004. Towards transcript profiling of desiccation tolerance in *Xerophyta humilis*: Construction of a normalized 11 k X. *humilis* cDNA set and microarray expression analysis of 424 cDNAs in response to dehydration. *Physiologia Plantarum*. 122:39–53.
- Cosgrove DJ.** 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:109–124
- Crowe JH, Carpenter JF y Crowe LM.** 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Reviews Plant Physiology* 60:73–103

- Dietz K.J.** 2003. Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells. *International eReviews in Cytology*. 228:141–193
- Dóczy R., Kondrák M., Kovács G., Beczner F. y Bánfalvi Z.** 2005. Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 43;269–76.
- Dure L.** 1993a. Structural motifs in LEA proteins. En *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. TJ Close, EA Bray, eds, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. pp 91–103.
- Dure, L.** 1993b. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant journal*. 3: 363–9.
- Dure L., Crouch M., Harada J. y Ho T.** 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*. 12:475–486.
- Edreva A.** 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.
- Farrant J.M. y Sherwin H.W.** 1997. Mechanisms of desiccation tolerance in seeds and resurrection plants. In: Taylor AG, Huang XL (eds) *Progress in seed research. Proceedings of the second international conference on seed science and technology*. Communication Services of the New York State Agricultural Experimental Station, Geneva, NY, pp 109–120
- Farrant J. M., Willigen C. Vander, Loffell D. A., Bartsch, S. y Whittaker, A.** 2003. An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. *Plant, Cell and Environment*. 26:1275–1286.
- Frankel N., Nunes-Nesi A., Balbo I., Mazuch J., Centeno D., Iusem N. D., Fernie A. y Carrari F.** 2007. ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant molecular biology*. 63:719–30.
- Fridovich, I.** 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of biochemistry and biophysics*, 247: 1–11.
- Gaff D.F.** 1971. Desiccation tolerant flowering plants in southern Africa. *Science*. 174:1033-1034.

- Gaff D.F.** 1987. Desiccation-tolerant plants in South America. *Oecología*. 74:133-136.
- Goldgur Y., Rom S., Ghirlando R., Shkolnik D., Shadrin N., Konrad Z. y Bar-Zvi D.** 2007. Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant physiology*, 143:617–28.
- Goode B. L. y Eck M. J.** 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual review of biochemistry*, 76:593–627.
- Goyal K., Walton L. J. y Tunnacliffe A.** 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *The Biochemical journal*. 388:151–157.
- Grabherr M. G., Haas B. J., Yassour M., Levin J. Z., Thompson D. A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., Di Palma F., Birren B., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedmen N. y Regev, A.** 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*. 29:644–52.
- Hare P.D., Cress W.A. y Van Staden J.** 1998. Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*. 21:535–553
- Hutin C., Nussaume L., Moise N., Moya I., Kloppstech K., y Havaux M.** 2003. Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:4921–4926.
- Hoekstra F. A, Golovina E. A, Tetteroo, F. A., y Wolkers W. F.** 2001. Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiology*. 43:140–50.
- Hoekstra F.A.** 2005. Differential longevities in desiccated anhydrobiotic plant systems. *Integrative and Comparative Biology*. 45:725–733.
- Ingle R.A., Schmidt U.G., Farrant J.M., Thomson J.A. y Mundree S.G.** 2007. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Plant, Cell and Environment*. 30:435-446.

- Leinonen R., Diez F. G., Binns D., Fleischmann W., Lopez R. y Apweiler R.** 2004. UniProt archive. *Bioinformatics*. 20:3236–3237.
- Jeanneau M., Gerentes D., Foueillassar X., Zivy M., Vidal J., Toppan A. y Perez P.** 2002. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie*, 84:1127–1135.
- Kader J.C.** 1996. Lipid-Transfer Proteins in Plants. Annual review of plant physiology and plant molecular biology. 47:627–654.
- Li B. y Dewey C. N.** 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12:323.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K.** 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant cell*. 10:1391–1406.
- Medina J., Ballesteros M. L. y Salinas J.** 2007. Phylogenetic and functional analysis of Arabidopsis RCI2 genes. *Journal of experimental botany*. 58: 4333–46.
- Montané M., Dreyer S., Trianthaphylides C. y Klopptech K.** 1997. Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. *Planta*, 202:293-302.
- Moore J.P., Le N.T., Brandt W.F., Driouic A. y Farrant J.M.** 2009. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*. 14:110-117.
- Mouillon J., Gustafsson P. y Harryson P.** 2006. Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant physiology*, 141: 638–650.
- Mowla S. B., Thomson J. A., Farrant J. M. y Mundree S. G.** 2002. A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. *Planta* 215:716–726.

Neale A. D., Blomstedt C. K., Bronson P., Le T.N., Guthridge K., Evans J., y Hamill J. D. (2000). The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during severe drought stress. *Plant, Cell and Environment*. 23:265–277.

Patel R. K. y Jain M. 2012. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLoS ONE* 7: e30619.

Peters S., Mundree S. G., Thomdon J. A., Farrant J. M. y Keller F. 2007. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit, *Journal of Experimental Botany*. 58:1947-1956.

Porembski S. y Barthlott W. 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology*. 151:19-28.

Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R. y Lopez R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research*, 33.

Ramanjulu S. y Bartels D. 2002 Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25:141–151.

Reyes J., Rodrigo M., Colmenero-Flores J., Gil J., Garay-Arroyo A., Campos F., Salamini F., Bartels D. y Covarrubias A. 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment*. 28:709–718.

Robinson M. D., McCarthy D. J. y Smyth G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26:139–140.

RoyChoudhury A., Roy C. y Sengupta D. N. 2007. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene Rab16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant cell reports*, 26:1839–1859.

Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot M., Menzel W., Granzow M. y Ragg, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*. 7:1-14.

Sherwin H. W. y Farrant J. M. 1998. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regulation*, 24:203–210.

Shigyo M., Hasebe M. y Ito M. 2006. Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene*, 366:256–265.

Stockinger E. J., Gilmour S. J., y Thomashow M. F. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:1035–1040.

Thomson W.W. y Platt K.A. 1997. Conservation of cell order in desiccated mesophyll of *Selaginella lepidophylla*. *Annals of Botany* 79:439–447.

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

Tompa P. 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends in biochemical sciences*. 27:527–33.

Tompa P., Szász C. y Buday L. 2005. Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends in biochemical sciences*. 30:484–9.

Tuba Z., Protor C., y Csintalan Z. 1998. Ecophysiological responses of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation tolerant plants: a comparison and an ecological perspective. *Plant Growth Regulation*. 24:211–217.

Vicré M., Sherwin H.W., Driouich A., Jaffer M.A. y Farrant J.M. 1999. Cell wall characteristics and structure of hydrated and dry leaves of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*, a microscopical study. *Journal of Plant Physiology* 155:719–726.

Vicré M., Lerouxel O., Farrant J.M., Lerouge P. y Driouich A. 2004. Composition and desiccation-induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*. *Physiologia Plantarum* 120:229–239.

Wang C., Zhang L. J., y Huang R. D. 2011. Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 6:29–31.

- Wang F. Z., Wang Q. B., Kwon S. Y., Kwak S. S. y Su W. A.** 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of plant physiology*. 162:465–72.
- Wang X., He Y., Zheng L., Liu W., Hu Y., Chen H. y He Y.K.** 2009. Exploring the Mechanism of *Physcomitrella patens* Desiccation Tolerance through a Proteomic Strategy. *Plant physiology*, 4:435–437.
- Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K.** 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & general genetics*. 238: 17–25.
- Yang C., Chen Y., Jauh G. y Wang C.** 2005. A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 139:836–846.
- Yi K., Guo C., Chen D., Zhao B., Yang B., y Ren H.** 2005. Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 138:1071–1082.
- Zeng Q., Chen X., y Wood A. J.** 2002. Two early light-inducible protein (ELIP) cDNAs from the resurrection plant *Tortula ruralis* are differentially expressed in response to desiccation, rehydration, salinity, and high light. *Journal of experimental botany*. 53:1197–1205.