



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS DE *Saccharum officinarum* L. ANTE ESTRÉS OSMÓTICO A TRAVÉS DE UN ENFOQUE TRANSCRIPTÓMICO

Tesis que presenta

EDYCIEL JORDÁN ALVARADO ROBLEDO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **EDYCIEL JORDÁN ALVARADO ROBLEDO**, titulado “**ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS DE *Saccharum officinarum* L. ANTE ESTRÉS OSMÓTICO A TRAVÉS DE UN ENFOQUE TRANSCRIPTÓMICO**”, fue realizado en el laboratorio de Fisiología Molecular y Transformación Genética de Plantas de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región porque está orientada hacia la economía basada en conocimiento.

Atentamente:

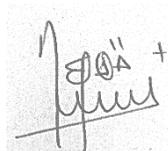
Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de junio de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:



Nombre: Edyciel Jordán Alvarado Robledo

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., y forma parte del proyecto titulado BASE BIOTECNOLÓGICA PARA LA INNOVACIÓN Y EL DESARROLLO DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR TOLERANTES A SEQUÍA PARA ZONAS DE TEMPORAL EN MÉXICO-Primera etapa. PDCPN-2013-01 215098 bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida, la fuerza, la capacidad y las oportunidades para existir, creer y actuar. Por tanto favor a pesar de mi condición, por cada sueño cumplido y por cada suspiro cristalizado como una meta cumplida. Gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (407566) para la realización y culminación de los trabajos, experimentos, escritos y trámites inherentes a la maestría en ciencias biológicas.

A todo el personal académico, administrativo y de servicios que labora en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), especialmente al área de posgrado y docencia: Dr. Manuel Martínez Estévez, C.P. Liligelia García Cano, Ing. Nancy Sulub, Verónica Vera, Alejandra Arceo y Landy Rodríguez; también agradezco a los investigadores que me impartieron cátedras, así como a la Unidad de Biotecnología especialmente a la Dra. María Marcela Gamboa Angúlo (Coordinadora de Posgrado) y al Ing. Rangel Gamboa.

Al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, entrañable científico soñador, profesor, amigo y mentor, por la gran paciencia y humildad que demostró en mi estancia en su laboratorio.

A los integrantes de mi comité tutorial, los Doctores: Víctor Manuel Baizabal, Enrique Castaño De la Serna y Gabriel Lizama Uc por sus aportaciones y la paciencia demostrada durante mi formación académica así como al Dr. Manuel Martínez Estévez.

A mis tres grandes mentores durante este periplo por el posgrado, por su ayuda, su amistad y por ver el potencial que hay en mí. Al Dr. Alejandro Pereira Santana, M. en C. Jesús Alejandro Zamora Briseño, así como el Dr. Víctor Manuel González Mendoza.

Al M. en C. Miguel Herrera Alamilla por sus aportaciones en lo que atañe al arte del cultivo *in vitro* así como por su amistad; al M. en C. Francisco Leonel Espadas y Gil, por su apoyo en las mediciones fisiológicas y en el desarrollo del análisis estadístico.

A los amigos que conforman el Laboratorio de Fisiología Molecular y Transformación Genética de Plantas de la Unidad de Biotecnología: QFB. Miguel Ángel Llanes, M. en C. Christian Alcocer Jáuriga, M. en C. Jorge Luis Espadas Alcocer, M. en C. Samuel David Gamboa Tuz, M. en C. Sandi Julissa Reyes Hernández, M. en C. Gabriela Flores Vargas, M. en C. Ricardo Ortiz Luévano, Biol. Aarón G. Cantón, Ibq. Karina Sosa, Ibq. Merly Itza,

Ibq. Evelyn Carrillo, Ibq. Carolina Sulú, Ibq. Irma Angélica Jiménez Ramírez, IBT. Ángela Berenice Gordillo Tello así como al IBT. Mariano Sánchez Santiz.

A las amistades y lazos de compañerismo de las diferentes unidades generados durante mi estancia en el posgrado y que hicieron placentera y gratificante mi estancia en CICY.

A la comunidad de las Iglesias Cristianas Ministerios Elohim y Renuevo de Dios, por creer en mí, apoyarme y darme las facilidades para desarrollar mis talentos.

A la familia Velázquez Carbajal, por sus consejos y cariño sinceros, a la familia Medina Puerto por su ayuda en momentos de crisis, así como a las familias: Canul Cua, Cauich Molina, Cruz Medina, González Chávez, Lee Cob, Lee Landero, López Sandoval, Matey Vivas, Novelo Puerto, Pat Cua, Rodríguez Rejón, Velázquez Gamboa y Yerves Fuentes.

A las siguientes personas que de corazón me tendieron la mano: M. en C. Hazel Yurai Michel Hernández por la bella amistad y su apoyo sin doblez, al Enfro. Jesús Marín Gallegos por su amistad y compañerismo sin mácula, a la Sra. Adriana Espinosa por su aprecio sincero; al Lic. Miguel Ángel Martínez por su fina amistad; a la Ibt. Juana Ruiz López, por apoyarme haciendo ver lo bueno que hay en mí y lo que aún me resta por hacer; a la Ing. Fabiola Karina Trujillo Aguilar por creer en mí y por ver cualidades y virtudes que puedo explotar a favor de los demás; a la Ibt. María Magdalena Méndez Juárez; al M. en C. Jimmy Josué Ceballos Cruz; M. en C. Lía Sarahí Valencia Chan y la Q.F.B Cristina Marisol Castillo Bautista, a ellos por su bella amistad y consejos.

A Raquel Amisadai Xacur Chac, por su increíble ayuda y por creer en mí.

A mis amigos de toda la vida: Carlos Hugo Silvestre Marcos, César Pérez Cruz, Merari Reyes González, Martín Roblero Mazariegos, Carlos Manuel Morales Vázquez, Ricardo Sánchez Cruz, Antonio Cruz Duque, Wildy David, Manuel Gutiérrez Bartolón, Pedro Domingo Salas, Oscar Manuel Recinos Vázquez, Edwin de Jesús Suárez Morales, Hugo Gabriel Pinto, Héctor Iván Barrios Ross.

A todas las personas que de una u otra forma me han ayudado, son muchos pero se dan por aludidos, al igual que a todas aquellas que me dejaron cuando más les necesitaba porque me hicieron madurar y avanzar.

DEDICATORIAS

Todo elogio y vitor que derive de la realización del presente trabajo van dedicados a Dios, por tanto favor, gracia, paciencia y bendiciones. Por haberme guiado a conseguir una de mis metas profesionales en la vida, inspirándome y conminándome día a día a través de una y cien mil maneras para ser un verdadero agente de cambio. Por darme todo.

A mi familia, especialmente a mis abuelos, el Sr. Santos Julio Robledo Escobar y a la Sra. Celia De León Orantes, por tanta dedicación, consejos, vivencias y amor; a mi familia nuclear, a la mujer más bella del mundo, mi madre Cielo, y a mis hermanos Daniel y Marinthia, por creer en mí y apoyarme. Este logro también es suyo.

A las familias Robledo González, Robledo Roblero y Trejo Robledo por su incondicional apoyo, por los años invertidos en mi formación y por tanto cariño y paciencia. Con cariño para mi tía Helena Osorio Campos, a mis primos Edward y Christian Castañeda Osorio así como para mi tía Yajaira Alvarado y mis primos Jefferson y Josué Edyciel.

A todos los que de corazón predicán las Buenas Nuevas, a quienes no claudican de su fe ni quebrantan sus convicciones; a los que hacen el bien y luchan, trabajan y se esfuerzan por sus metas; a los que han experimentado los sinsabores de la vida y que están en búsqueda de la felicidad; a los que se han quedado sin nada por los avatares de la vida pero que se esfuerzan por ser ese cambio que el mundo necesita.

“Ha escogido lo sin importancia según el mundo, lo despreciable, lo que nada cuenta, para anular a quienes piensan que son algo.”

ÍNDICE

RESUMEN	X
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.2. Mecanismos de acción en respuesta a estrés	7
1.2.1 Respuestas desencadenadas por exposición a estrés osmótico	9
1.2.2 Polietilenglicol como agente inductor de estrés	14
1.2.3 Relaciones hídricas en la célula vegetal.....	15
1.2. 4 Relevancia del ácido abscísico (ABA) en respuesta a estrés.	20
1.3 Clasificación Taxonómica de <i>Saccharum officinarum</i> L	22
1.3.1 Importancia económica	23
1.3.2 Cultivo in vitro en caña de azúcar	26
1.3.4 <i>Sobre la implementación de herramientas transcriptómicas en plantas</i>	28
1.3.5 Sobre algunos estudios de genómica funcional en <i>Saccharum officinarum</i> L.....	31
JUSTIFICACIÓN	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
CAPÍTULO II ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE <i>Saccharum officinarum</i> L. SOMETIDAS A ESTRÉS OSMÓTICO	39
2.1 INTRODUCCIÓN	39
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.2.1 Material biológico	40
2.2.2 Mediciones fisiológicas y bioquímicas en vitroplantas de <i>S. officinarum</i> L. sometidas a estrés osmótico	40
2.2.3 Medición de tasa fotosintética neta y de tasa de transpiración.....	40
2.2.4 Relaciones hídricas.....	40
2.2.5 Software y paquete estadístico	41
2.2.6 Determinación del contenido de prolina.....	41
2.3 RESULTADOS.....	42

2.3.1 Fenotipificación y medición de parámetros fisiológicos y bioquímicos de vitroplantas de <i>S. officinarum</i> L bajo condiciones de estrés osmótico	42
2.3.2 Cuantificación de prolina como parámetro bioquímicos en vitroplantas de <i>S. officinarum</i> L bajo condiciones de estrés osmótico	44
2.3.3 Evaluación de parámetros fisiológicos de vitroplantas en <i>S. officinarum</i> L bajo condiciones de estrés osmótico.....	45
2.4 DISCUSIÓN	47
2.5 CONCLUSIONES	50
CAPÍTULO III ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE VITROPLANTAS DE <i>Saccharum officinarum</i> L. EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO Y DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-qPCR.....	51
3.1 INTRODUCCIÓN	51
3.1.2 Validación por RT-qPCR.....	52
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.2.1 Inducción del estrés osmótico en plántulas de <i>S. officinarum</i> L.....	54
3.2.2 Extracción de ARN total de tejidos de hoja y raíz	55
3.2.3 Flujo de análisis bioinformático	56
3.2.4 Construcción de las bibliotecas	57
3.2.5 Análisis de la expresión diferencial y anotación por GO (Gene Ontology)	58
3.2.6 Análisis de datos.....	58
3.2.7 Extracción de ARN, validación por RT-qPCR.....	58
3.3 RESULTADOS	60
3.3.1 Extracción de RNA total de tejidos de hoja y raíz	60
3.3.2 Ontogenia y anotación de unigenes	61
3.3.3 Análisis global de los DEGs (genes expresados diferencialmente) en condiciones de estrés osmótico	63
3.3.4 Grupos de transcritos compartidos entre tratamientos de estrés (hoja y raíz)	65
3.5 DISCUSIÓN	73
3.6 CONCLUSIÓN	80
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES GENERALES	81
4.1 CONCLUSIONES	81
4.2 PERSPECTIVAS	84
BIBLIOGRAFÍA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Aspectos multifactoriales e interrelación del estrés y de la planta.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 1.1 Interconexión del estrés abiótico y las respuestas de la planta.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 1.2 Mapa del Monitor de sequía actualizado al 28 de febrero de 2017</i>	<i>6</i>
<i>Figura 1.3 Mecanismo de respuesta ante estrés</i>	<i>8</i>
<i>Figura 1.4 Biosíntesis de prolina</i>	<i>12</i>
<i>Figura 1.5 Representación esquemática de un par de moléculas de agua</i>	<i>15</i>
<i>Figura 1.6 Movilización de moléculas de agua a través de la membrana.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 1.7 Desplazamiento compartimentado de moléculas de agua.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 1.8 Producción mundial de caña de azúcar en el ciclo 2015-2016.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 1.9 Regiones Cañeras de México.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 1.10 Plántulas de caña de azúcar.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 1.11 Diagrama de flujo de pasos implícitos en método RNA-seq.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 1.12 Esquematización de la estrategia experimental general.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 2 Fenotipificación de vitroplantas sometidas a estrés osmótico.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 2.1 Cuantificación de prolina (Pro) en tejidos de caña de azúcar.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 2.2 Mediciones fisiológicas.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 3 Representación esquemática del diagrama de inducción del estrés osmótico hasta la obtención de bibliotecas con sus respectivos transcritos.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 3.1 Electroforesis en gel de agarosa al 1%</i>	<i>60</i>
<i>Figura 3.2 Ontogenia y anotación del total de unigenes expresados en respuesta a estrés osmótico.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 3.3 Correlación y agrupación de los DEGs sometidos a estrés osmótico.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 3.4 Análisis comparativo de los DEGs</i>	<i>66</i>
<i>Figura 3.5 Cuantificación de la expresión relativa en hoja.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 3.6 Cuantificación de la expresión relativa en raíz</i>	<i>71</i>



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Resultado de búsqueda de genes que codifican para osmoprotección.....	13
Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	22
Cuadro 3 Características de primers usados para validar el transcriptoma.....	59
Cuadro 3.1 Niveles de expresión génica en tejido de raíz de <i>S. officinarum</i> L.....	78
Cuadro 3.2 Niveles de expresión génica en tejido de hoja de <i>S. officinarum</i> L.....	79



ABREVIATURAS (Por sus siglas en inglés)

ABA: Acido abscisico (Abscisic Acid)

ABIP3: Acido abscísico 8 - hidroxilasa 3 - similar (Abscisic acid 8 -hydroxylase 3-like)

ABRE: Elemento de respuesta a ácido abscisico (ABA Responsive Element)

ABF: Factores de unión a ABRE (ABA Binding Factor)

ACT: Actina (Actin)

AP2: Apetala 2

AP2/ERF: Apetala 2/Factor de respuesta a etileno (AP2)/ethylene responsive factor (ERF)

AREB: Proteínas de unión a ABRE (ABA-responsive element-binding protein)

ATP: Trifosfato de adenosina (Adenosine triphosphate)

BLAST: Alineamiento de secuencias tipo local (Basic Local Alignment Search Tool)

CAT: Catalasa

CDLG: Core de genes regulados a la baja en hojas

CDRG: Core de genes regulados a la baja en raíz

CORE: Unigenes con actividad transcripcional en todos los tratamientos

COSUG: Core de genes regulados a la alza en estrés osmótico

COSDG: Core de genes regulados a la baja en estrés osmótico

CRT: Elemento de respuesta de repetición C (C-repeat responsive element)

CULG: Core de genes regulados a la alza en hojas

CURG: Core de genes regulados a la alza en raíz

DEG: Genes expresados diferencialmente

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

DRE: Elemento de respuesta a deshidratación (Dehydration Responsive Element)

DREB: Unión de elemento sensible a deshidratación (Dehydration Responsive Element Binding)

ERF: Factor de respuesta a etileno (Ethylene Responsive Factor)

EST: marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tag)

FAD: Flavín Adenín Dinucleótido

FT: Factor de transcripción

GO: Ontología de genes (Gene ontology)

GR: Glutación reductasa

kD: Kilodalton

LEA: Proteínas de la embriogénesis tardía (Late Embryogenesis Abundant Proteins)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (Messenger RNA)

MT: Millones de toneladas

NAC: Factor de transcripción NAC (no apical meristem cup-shaped cotyledon)

NGS: Secuenciación de próxima generación (Next Generation Sequencing)

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

Pip2: Fosfatidil inositol 4,5- bifostato (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)

PEG: Polietilenglicol

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

RNA-seq: Secuenciación de ARN (RNA-Sequencing)

RT-qPCR: PCR cuantitativo (Quantitative Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)

SuperSAGE: Análisis en Serie de la Expresión Génica (Super Serial Analysis of Gene Expression)

Stk: Serina Treonina Cinasa (Serine threonine- kinase)

SOD: Super óxido dismutasa

Sweet6a: Transportador Bidireccional de Azúcar (Bidirectional sugar transporter SWEET6a-like)

TPM: Transcripciones por millón de transcritos

V: volumen molar del agua

μL : microlitros

μ : Potencial químico del agua en la muestra

μ° : Potencial químico de referencia del agua

Ψ : Potencial hídrico de la muestra

Ψ_p : Potencial de presión

Ψ_s : Potencial osmótico

Ψ_m : Potencial mátrico

Ψ_g : Potencial gravitacional



RESUMEN

Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) es una de las especies con mayor relevancia económica y agrícola dado que a partir de ella se obtienen una serie de productos de gran importancia tales como la sacarosa y alcohol; sin embargo, este cultivar a menudo es afectado por la incidencia de diferentes factores abióticos tales como la salinidad y la sequía, los cuales desencadenan un estrés del tipo osmótico. Para hallar una solución a esta problemática, es necesario entender las respuestas a nivel molecular ante la imposición de estrés para identificar los genes que se activan transcripcionalmente. En la presente investigación, se realizó un ensamble *de novo* de la variedad Mex 69-290 sometida a estrés osmótico.

Con base al diseño experimental, se obtuvo la secuenciación de 16 bibliotecas, usando la plataforma Illumina^R Hi-Seq paired end Sequencing 2x100, con lo cual se obtuvo un rendimiento de 410 millones de lecturas depuradas. Se hallaron 252,702 transcriptos totales de los cuales 140,349 correspondieron a unigenes los cuales se agruparon según procesos biológicos, componentes celulares, así como su respectiva función molecular. Además, se realizó la validación del transcriptoma mediante RT-qPCR. Para dar mayor robustez al trabajo, se realizaron mediciones a parámetros fisiológicos y bioquímicos para hallar la correlación con la parte molecular.

Los resultados obtenidos del presente trabajo pueden servir para la identificación, clonación y sobreexpresión de genes de interés para generar conocimiento básico o bien aplicado para la biotecnología además de proveer información de genes que responden de manera específica en determinado tejido bajo condiciones de estrés osmótico.



ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L) is an agricultural and economical species given that it provides items such as sucrose and alcohol; however, this crop is affected by abiotic factors like drought and salinity which lead to osmotic stress. To encounter a solution of this handicap, it is necessary to understand the responses at the molecular level during the stress imposition for the identification of transcriptionally activated genes. In the present investigation research, a *de novo* assembly was made in *Mex 69-290* variety under osmotic stress.

In accordance with experimental design, 16 libraries were obtained and sequenced using Illumina[®] Hi-Seq paired end Sequencing 2x100 platform, with a yielding of 410 million of clean reads. Were found 252,702 total transcripts which 140,349 corresponding to unigenes categorized in biological process, cellular components and molecular function. Therefore, transcriptome validation by RT-qPCR technique was realized. To make robust at this work, biochemical and physiological measurements were performed to find correlations between molecular aspects.

Results obtained in this project may help to identify, clone and overexpress genes of interest to generate basic knowledge or applied for biotechnology in addition to provide information about genes and their specific response in certain tissue under osmotic stress exposure.



INTRODUCCIÓN

Como organismos sésiles, las plantas hacen frente a una serie de escenarios ambientales adversos que desencadenan una serie de respuestas a nivel molecular, celular y fisiológico; siendo el estrés osmótico el principal fenómeno que se induce por la sequía y salinidad en donde numerosos genes, proteínas o factores de transcripción desempeñan funciones imprescindibles para recuperar la homeostasis de manera integral.

Una posible solución radica en aumentar el rendimiento de especies vegetales cultivables mediante el diseño de variedades mejoradas. Para ello, se requiere la comprensión de la función de diferentes macromoléculas tales como genes, genomas, redes reguladoras inherentes al crecimiento, desarrollo y/o tolerancia ante estrés abiótico (Takeda y Matsuoka 2008).

Actualmente, con la implementación y establecimiento de nuevas tecnologías de secuenciación masiva de genes, se ahonda, en el descubrimiento y análisis de genes, cuyas caracterizaciones funcionales permiten ser utilizados para incrementar el rendimiento de cultivares ante diferentes estreses ambientales (Mochida y Shinozaki, 2010).

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) perteneciente a la familia *Poaceae*, se caracteriza por producir un gran contenido de sacarosa en sus tallos. Éste cultivar es la principal fuente de alcohol y azúcar, supliendo aproximadamente dos tercios de la producción mundial de azúcar (Cardoso-Silva et al., 2014). Además, es considerado una importante fuente de alimento y bioenergía para diferentes países tropicales y subtropicales (Waclawovsky et al., 2010).

La incidencia de diferentes estreses abióticos, como la salinidad y sequía, afectan el crecimiento y productividad de este importante cultivo (Mahajan y Tuteja, 2005). Sin embargo, con la implementación de las herramientas de biología molecular e ingeniería genética, es posible dilucidar los procesos que subyacen en el modelo de estudio en respuesta al estrés y generar variedades genéticamente modificadas más tolerantes. En pro de dicha mejora, se han desarrollado una serie de estudios y protocolos en diversas variedades de caña de azúcar que van desde el cultivo de tejidos vegetales y transformación genética (Taparia et al., 2012; Bower et al., 1996; Snyman et al., 2006; Kumar et al., 2014; Dong et al., 2014; Eldessoky et al., 2011); hasta la búsqueda de genes

en respuesta al estrés y análisis de su expresión diferencial (Rodrigues *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011; Papini-Terzi, 2009; Kido *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2011; Gao y Chen, 2016)

Para analizar de manera masiva datos génicos, las disciplinas ómicas han demostrado ser exitosas en los programas de reproducción asistida para la selección de genotipos con características superiores aunado a estrategias de mejoramiento superiores (de Setta *et al.*, 2014), ya que con las nuevas tecnologías de secuenciación así como de las plataformas usadas en este tipo de investigación se puede prescindir de un genoma de referencia para realizar un ensamble de *novo* que, en la mayoría de los casos, es llevado a cabo en organismos no modelo (Bankar *et al.*, 2015)

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN

El crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas se ve influenciado por la presencia de diferentes tipos de estrés, tales como sequía, salinidad y bajas temperaturas. Estos estreses inducen una serie de cambios a nivel bioquímico y fisiológico, los cuales permiten la respuesta y adaptación de las plantas para su supervivencia (Seki *et al.*, 2003).

En particular la adaptación a la salinidad y sequía es un proceso complejo que involucra aspectos tales como la reducción total o parcial del crecimiento, activación o reducción de la expresión génica, incrementos de niveles de ABA, biosíntesis y acumulación de solutos compatibles, así como de proteínas protectoras aunado a un aumento de los niveles de antioxidantes y la supresión de vías que demandan un alto consumo energético (Bartels y Sunkar, 2005).

Los estreses abióticos limitan severamente el rendimiento y producción agrícola. La sequía es un problema que afecta la producción de caña viéndose en algunos casos, pérdidas en el rendimiento cercanas al 50% (Reis *et al.*, 2014) además de que a mediados del siglo XXI se especula que más la mitad de la capa arable destinada para agricultura tendrá graves problemas de salinización (Hrishikesh *et al.*, 2013). En este contexto, el estrés osmótico, el cual comprende la sequía y salinidad, afecta directamente el potencial hídrico en las células vegetales (Hohmann, 2002).

De manera interesante, se conoce que la supervivencia o detrimento de las plantas está mediada por determinados factores que interactúan entre sí, tales como el genotipo, etapa fenológica así como el tejido/órgano afectado por la incidencia del estrés; a su vez, el estrés puede presentar fluctuaciones en su severidad, duración, incidencia y/o combinación con otros tipos de estrés, idea que se esquematiza en la siguiente figura.

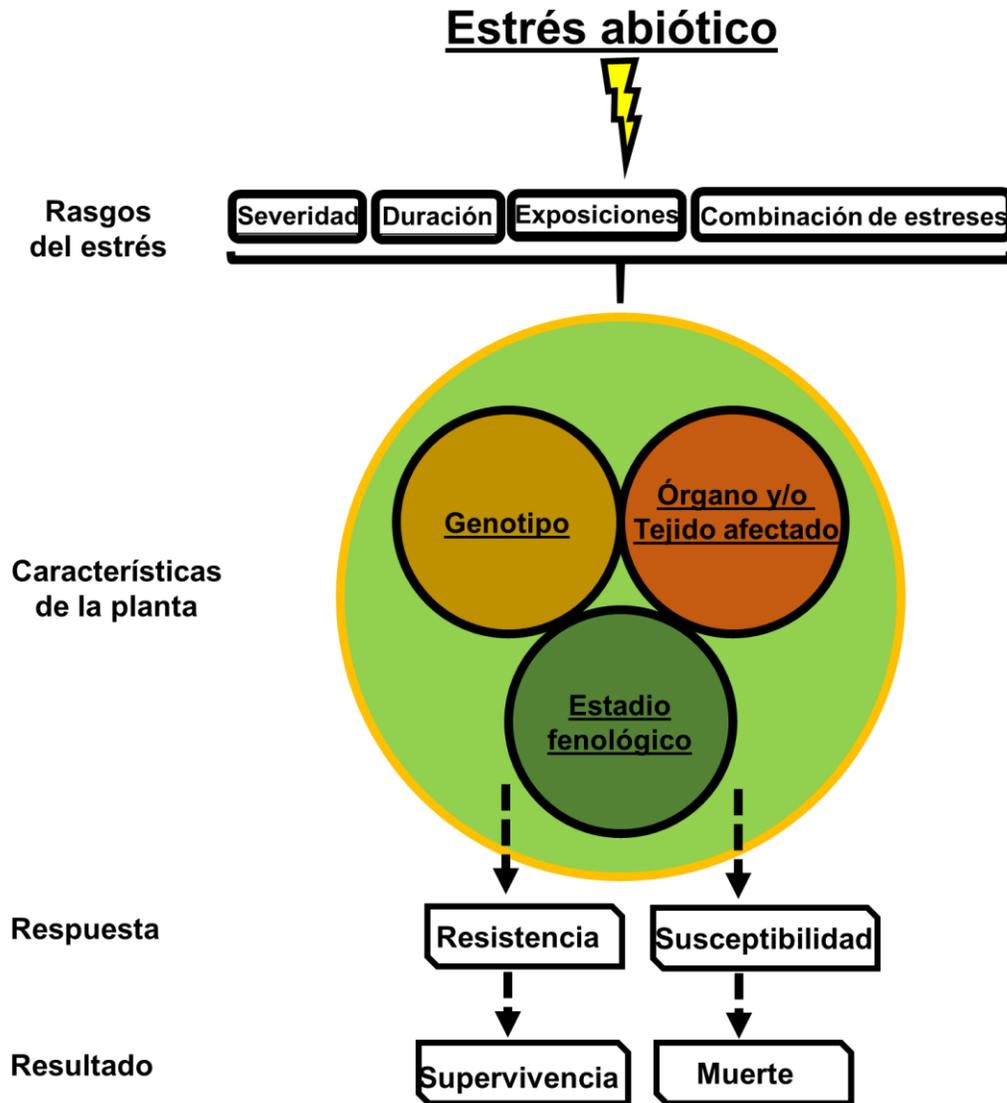


Figura 1. Aspectos multifactoriales e interrelación del estrés y de la planta. Tomado y adaptado de Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem, 2015.

Se visualizan los rasgos propios del estrés tales como la severidad, duración, número de exposiciones así como la interrelación que éstos puede haber entre diferentes tipos de estrés, los cuales incidirán y afectarán a la planta de tal forma que sus características como el estadio fenológico, el tejido u órgano afectado así como el genotipo de la misma determinarán la respuesta y resultado ante determinado estímulo.

Durante su ciclo de vida, las plantas se ven expuestas a numerosos estreses abióticos los cuales limitan su crecimiento, desarrollo y productividad; consecuentemente las plantas responden a estos factores alterando una serie de procesos celulares permitiéndoles cierta adaptación a un entorno cambiante (Kielbowicz et al., 2014); ahora bien, estos procesos de reprogramación implican múltiples alteraciones a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, las cuales incluyen cambios en la composición de la pared celular, estructura y función de la membrana celular así como del metabolismo primario y secundario (Knight y Knight, 2000; Murelli et al., 1995; Orvar *et al.*, 2000; Rajashekar y Lafta, 1996; Rao et al., 2016). Desde otra perspectiva, las respuestas vienen mediadas por genes estructurales, aquellos que codifican para las enzimas detoxificadoras, enzimas clave para la biosíntesis de osmolitos compatibles; las proteínas reguladoras como los factores de transcripción también desempeñan un papel relevante durante la imposición de estrés abiótico.

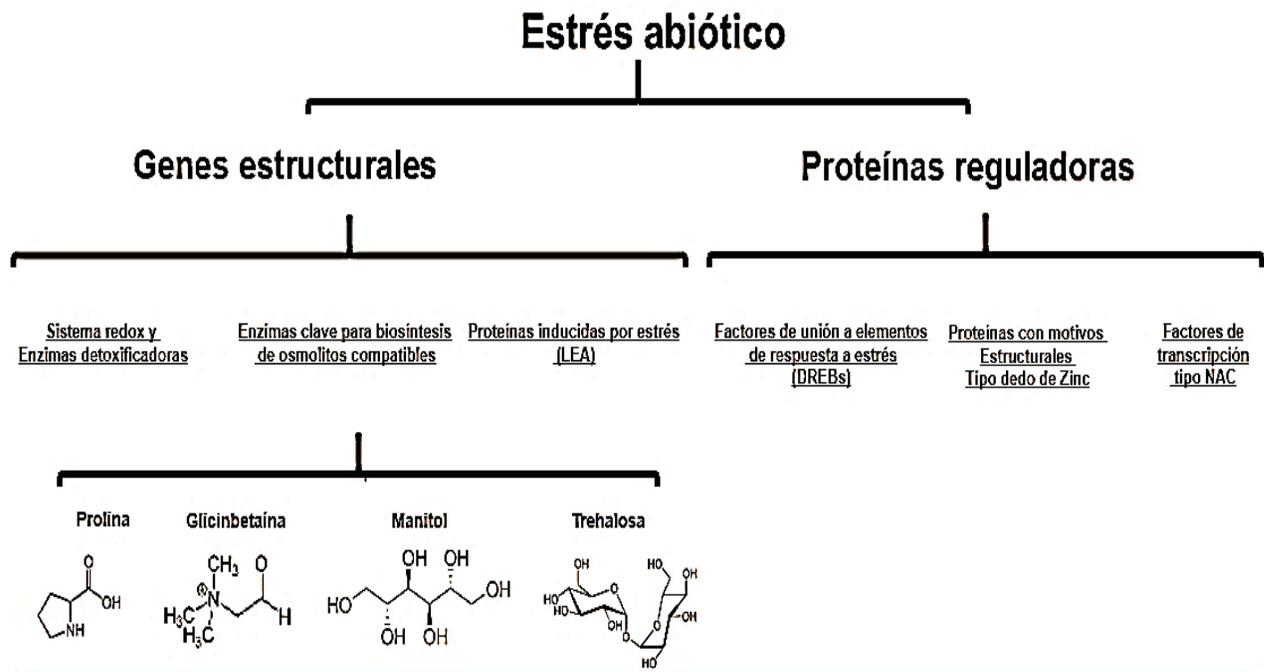


Figura 1.1 Interconexión del estrés abiótico y las respuestas de la planta. Tomado y adaptado de (Gosal et al., 2009). Se aprecian la bifurcación por parte del autor, de las respuestas que presenta la planta mediadas por genes estructurales y proteínas reguladoras.

Un aspecto importante a resaltar sobre la producción actual de alimentos viene mediada por los cambios ambientales globales y locales, los cuales afectan de manera negativa la producción alimentaria, de tal forma que se apunta a posibles repercusiones derivadas de actividades antropogénicas (Godfray y Garnett, 2014) siendo afectada la producción de cultivos por factores bióticos como la salinidad y sequía que afectan más del 10% de las tierras cultivables.

En el contexto de la disponibilidad de agua para fines agrícolas, a nivel nacional se cuentan con proyecciones por parte de la CONAGUA (Comisión Nacional del Agua) en las cuales se aprecia el comportamiento e intensidad de la sequía en todo el territorio nacional como un indicativo de este problema que asola a gran parte de las zonas agrícolas económicamente activas; según el Monitor de Sequía en México, al 18 de febrero del 2017, las condiciones que imperaron en el territorio nacional fueron las siguientes:

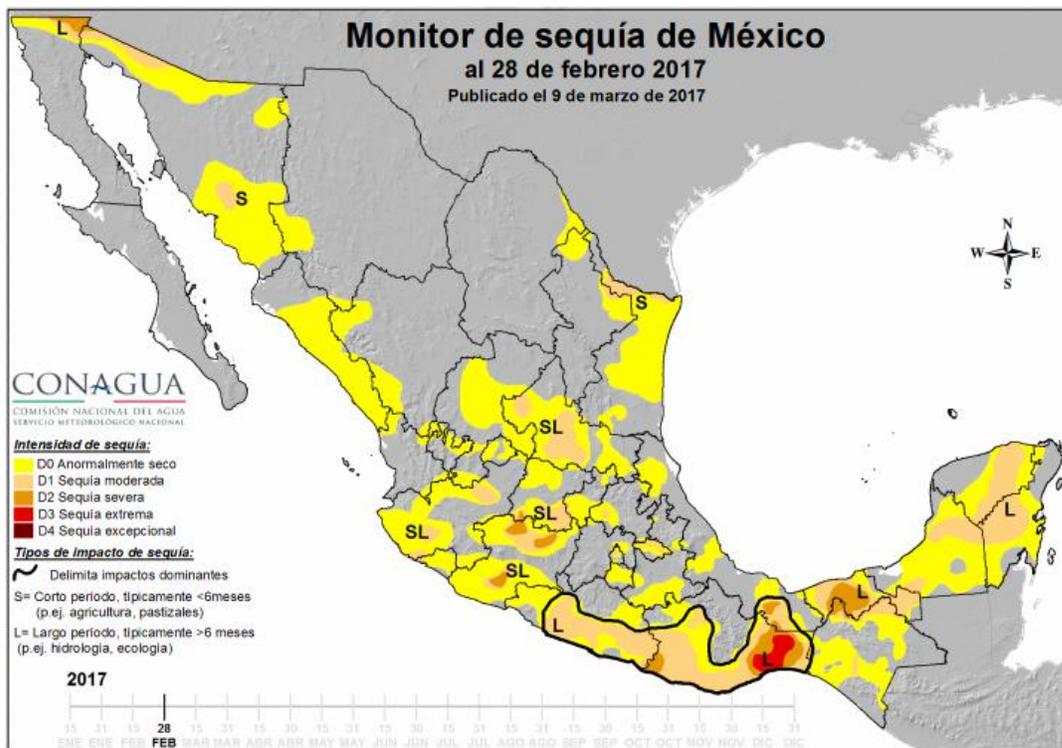


Figura 1.2 Mapa del Monitor de sequía actualizado al 28 de febrero de 2017.

Tomado de http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=20&Itemid=74

Se aprecia el impacto de la sequía en ciertas zonas del territorio nacional en donde la tonalidad de los colores indica el grado de afectación en donde tonalidades claras amarillentas indican grados de afectación anormales o leves hasta la coloración rojiza intensa denotan grados de afectación extremos y excepcionales.

1.2. Mecanismos de acción en respuesta a estrés

El estrés osmótico en las plantas es inducido por la salinidad y la sequía, el cual ocurre cuando las raíces entran en contacto directo con soluciones que contienen altas concentraciones de sales o agentes estresantes (Shavrukov, 2012). En respuesta, numerosos genes que codifican proteínas de señalización, cinasas y fosfatasa, numerosos factores de transcripción, entre otros, son activados. Estas moléculas desempeñan un papel indispensable en la transducción de señales durante la adaptación de la planta en respuesta al estrés osmótico.

Dicha adaptación abarca desde la percepción de la señal hasta la expresión génica (Yoshida et al., 2014), de tal forma que numerosos genes son inducidos confiriendo tolerancia aunado a una acumulación de ácido abscísico (ABA), una hormona clave en procesos de señalización (Yoshida et al., 2014; Finkelstein, 2013; Bartels y Sunkar, 2005; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

Se sabe que el estrés es percibido primeramente a través de los receptores presentes en la membrana de las células vegetales (Lorenzo *et al.*, 2009); con lo cual la señal es transducida hacia el interior de la célula conduciendo a la generación de segundos mensajeros que incluyen el calcio, las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el inositol fosfato; éstos segundos mensajeros modulan los niveles de calcio intracelular. Este calcio intracelular es detectada por diferentes proteínas con actividad enzimática que en sus dominio regulatorios se les une el calcio (sensores de calcio) (Chávez- Ramírez, 2010).

Por lo cual estas proteínas con actividad enzimática cambian su conformación estructural de manera dependiente de calcio dando como resultado una cascada de fosforilación, y activación de los principales genes de respuesta al estrés, los cuales son regulados por diferentes factores de transcripción (Klimecka y Muszynska, 2007). Éstos cambios son inducidos por el estrés en la expresión genética y participan en la generación de hormonas tales como el ABA, el ácido salicílico y el etileno; éstas moléculas pueden amplificar la señal iniciar una segunda vuelta de señalización que pueden seguir la misma vía o utilizar diferentes componentes en la vía de señalización (Chávez- Ramírez, 2010).

Ciertas moléculas, llamadas también moléculas accesorias o de ensamble, participan indirectamente en el alojamiento o activación de otras moléculas de señalización modificando su estructura y conformación. Éstas proteínas incluyen a los modificadores de proteínas que pueden realizar alteraciones postraduccionales tales como miristilación, glicosilación, metilación y ubiquitinación (Mahajan y Tuteja, 2005).

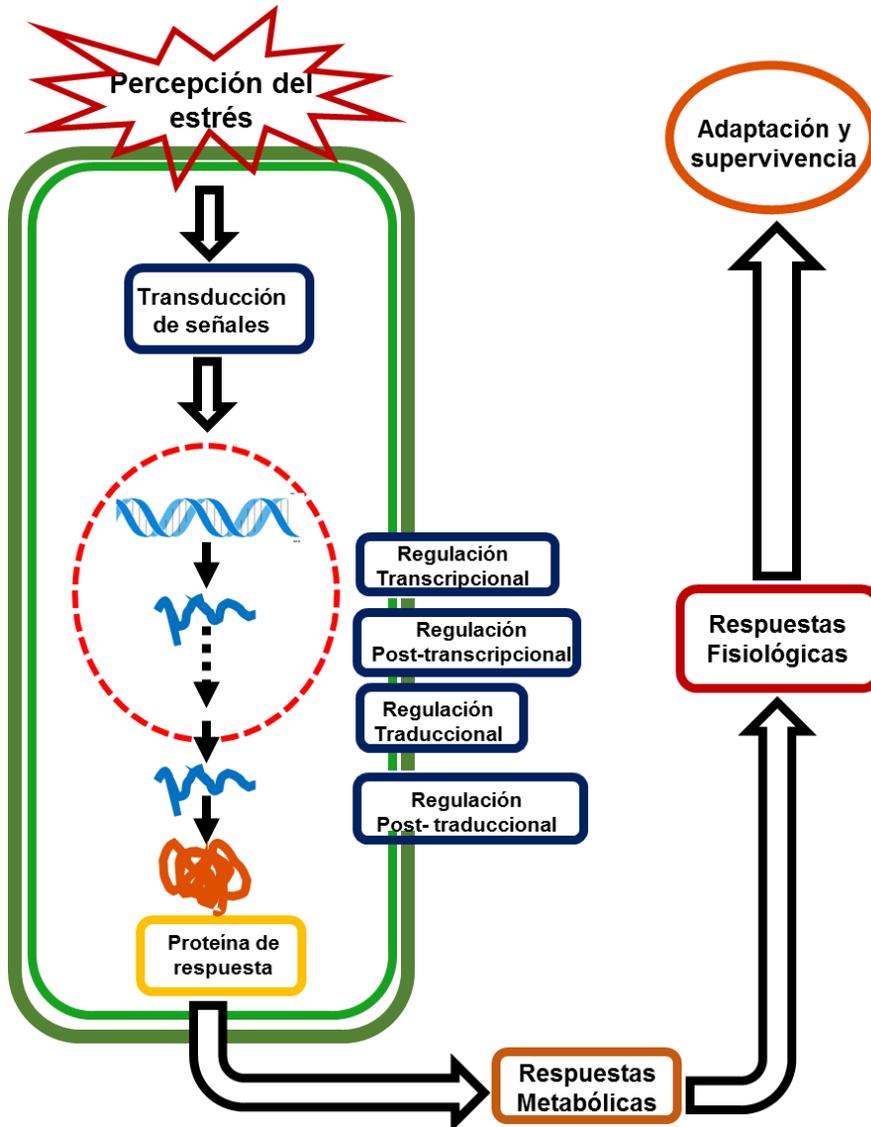


Figura 1.3 Mecanismo de respuesta ante estrés (modificado de Covarrubias-Robles 2007).

En el diagrama se ilustran aspectos tales como la percepción del estrés, seguido por la transducción de señales a las que le siguen regulaciones a nivel transcripcional y traduccional que median las respuestas metabólicas, fisiológicas que a su vez permitirán la adaptación y supervivencia en la planta.

En condiciones de salinidad o sequía, se activan una serie de reacciones enzimáticas que originan deshidratación celular, conllevando a un estrés osmótico que ocasiona una pérdida de agua a partir del citoplasma, dando como resultado una reducción de los volúmenes citosólico y vacuolar de la célula. Otro aspecto interesante es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a estrés que afectan las estructuras celulares y reacciones metabólicas tales como el decremento de fotosíntesis así fluctuaciones en los niveles de la hormona ABA (Bartels y Sunkar, 2005). Por otra parte, la célula vegetal tiene la facultad de minimizar o revertir los daños a través de mecanismos específicos, como lo es la síntesis, en el citosol, de una variada gama de solutos orgánicos e inorgánicos que mantienen la turgencia celular (Anjum *et al.*, 2011). Tal es la importancia de conocer los mecanismos moleculares y las respuestas de las plantas que se ha probado la funcionalidad del ajuste osmótico por medio de osmoprotectantes. Este conocimiento se ha alcanzado mediante el uso de plantas transgénicas en las que se apreció un aumento en las concentraciones de prolina, glicina betaína y/o pinitol (Kishor *et al.*, 1995; Sheveleva *et al.*, 1997; Takabe *et al.*, 1998).

1.2.1 Respuestas desencadenadas por exposición a estrés osmótico

Por convención, el estrés osmótico se refiere a la situación donde existe una insuficiente disponibilidad de agua, lo cual limita el crecimiento y desarrollo de la planta, que puede ser mediada por sequía o un exceso de sal en el agua (Kang Zhu *et al.*, 1997); a su vez, las plantas modulan la expresión de genes permitiéndoles la restauración de la homeostasis celular, procesos de detoxificación así como una recuperación en el crecimiento (Xiong-Zhu, 2002). Las células vegetales, perciben el estímulo del exterior a través de varios receptores localizados en la superficie celular (Rodríguez *et al.*, 2005) los cuales sufren diversos cambios conformacionales en sus respectivos dominios con actividad de cinasa, siendo las proteínas cinasas asociadas a membrana de dos tipos: 1) receptor con actividad de serina o treonina cinasa (RLKS), y 2) receptor con actividad de histidina cinasa (Urao *et al.*, 2001). Estos receptores median la intrincada transducción de señales, las cuales a su vez activarán, en el núcleo diversos factores de transcripción (FT) los cuales se unirán a regiones específicas adyacentes a elementos regulatorios encontrados en los promotores que regulan la expresión transcripcional de los genes en respuesta a estrés osmótico (OSRG), en donde al finalizar los procesos transcripcionales, el ARNm ya en el ribosoma, codificará para la síntesis de proteínas citoplasmáticas específicas.

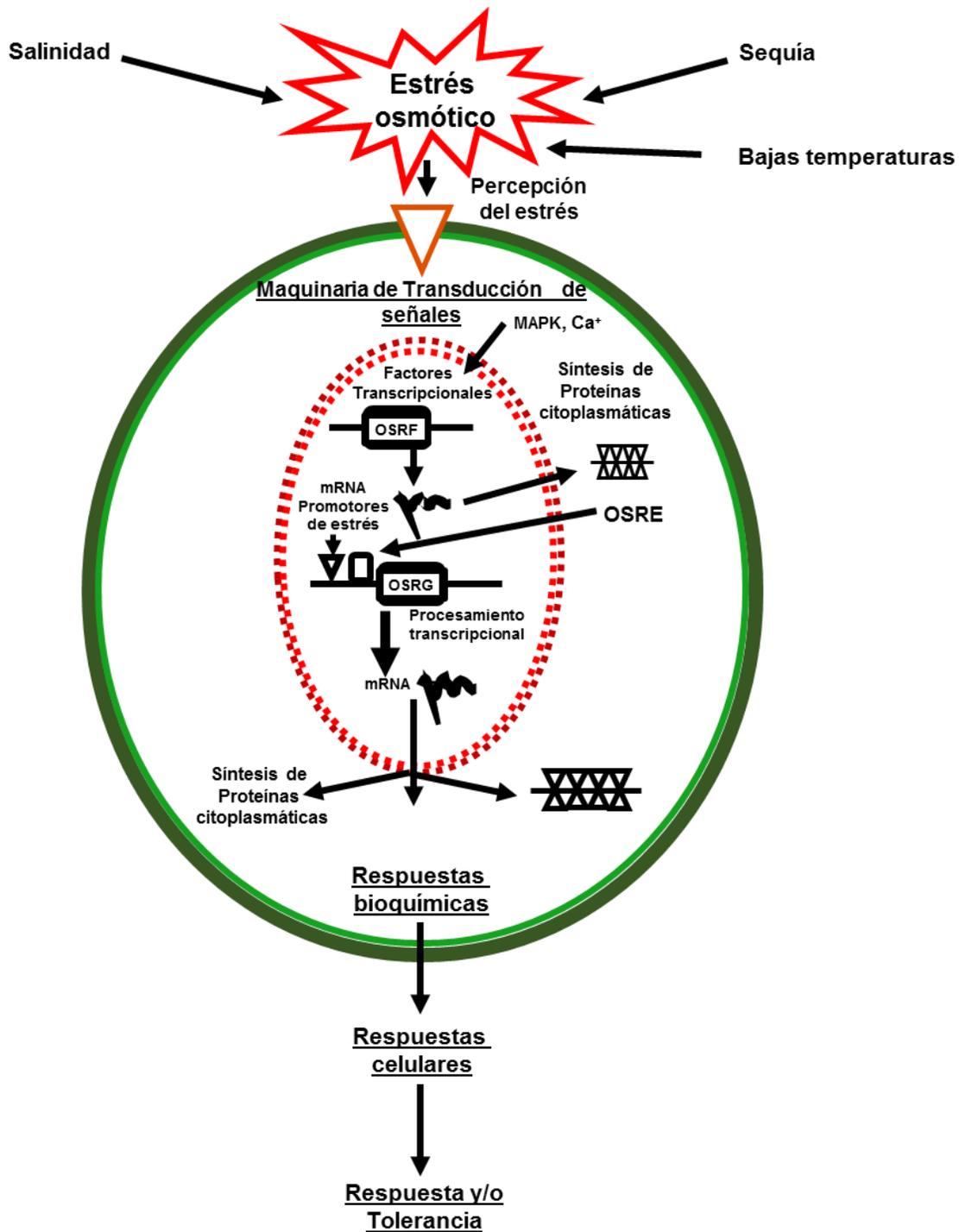


Figura 1.4 Modelo del conjunto de respuestas ante estrés osmótico. (Tomado y modificado de Upadhyaya *et al.*, 2013.). Se aprecia aspectos desde la percepción y transducción de señales hasta los aspectos de expresión génica.

Los mecanismos moleculares y bioquímicos son orquestados para salvaguardar y/o minimizar el efecto del estímulo ambiental. Entre los mecanismos resalta el ajuste osmótico (AO), el cual consiste básicamente en la acumulación de solutos en respuesta ante un déficit hídrico y la disminución del potencial hídrico total de hojas, tallos y raíces. Como resultado la planta puede absorber agua y mantener la actividad fisiológica (Robledo *et al*, 2007). Durante este proceso se ha visto que existe un aumento gradual de osmolitos compatibles en función de la intensidad del estrés (Gzik, 1996).

La acumulación de solutos compatibles tales como prolina (Pro) y glicina betaína (GB), es un mecanismo de protección en plantas ya que juegan un papel fundamental para facilitar la absorción de agua en respuesta a sequía o salinidad (Ashraf-Foolad, 2007). Además de que estos osmolitos son de vital importancia para la protección celular contra el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en condiciones de estrés. De esta manera, la acumulación de prolina es una respuesta fisiológica común en muchas plantas en respuesta a un amplio rango de estreses, siendo que su acumulación ocurre en eubacterias, protozoarios e invertebrados marinos (Verbruggen-Hermans 2008).

Dado que la acumulación de prolina es de suma importancia para la supervivencia de la célula, es necesario describir que en plantas existen dos precursores para prolina; glutamato y ornitina, el glutamato es convertido en prolina por dos sucesivas reacciones de reducción, las cuales son catalizadas por la enzima pirrolin-5-carboxilato sintasa (P5CS) y pirrolin-5-carboxilato reductasa (P5CR) respectivamente (Verbruggen-Hermans, 2008) siendo que su biosíntesis en el citosol pero es posible que la producción se mueva a los cloroplastos sobre el estrés (Székely *et al*, 2008). Para ilustrar los conceptos, se sugiere al lector analizar la Figura I.2.1.2.

Es necesario remarcar la importancia que puede tener la realización de estudios filogenéticos con miras a encontrar historias evolutivas de genes con potencial biotecnológico. Estudios concernientes al proceso de osmoprotección se han llevado a cabo dentro de los cuales, genes que codifican para la expresión de P5CS, P5CR entre otros (vías de trehalosa y betaína) fueron identificados con base en la base de datos de la caña de azúcar echando mano de secuencias de proteínas de arroz en donde hallaron ortólogos al hacer el análisis bioinformático (Barros *et al.*, 2011), lo cual sugiere la cercanía y parentesco a nivel evolutivo de los genes involucrados en osmoprotección.

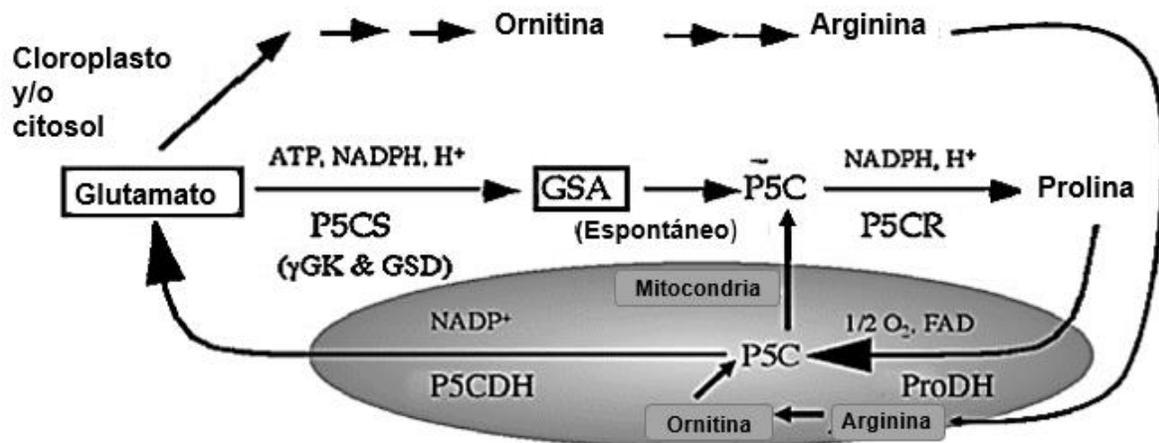


Figura 1.5 Biosíntesis de prolina. Adaptado de (Stein et al., 2011).

En la figura se aprecia la biosíntesis de prolina indicando genes y enzimas que participan en esta vía: GSA: Glutamato gamma semialdehído; P5C: delta-1 pirrolin-5-carboxilato; γGK: gamma-glutamil cinasa; GSD: semialdehído deshidrogenasa-gamma glutámico. P5CS: P5C sintetasa; P5CR: P5C reductasa; ProDH: prolina deshidrogenasa; P5CDH: P5C deshidrogenasa

En caña de azúcar se han llevado a cabo trabajos en donde la cuantificación de prolina demuestra un aumento en su biosíntesis al exponerse ante diferentes tipos de estrés, especialmente los de alta salinidad y osmótico. Se estudió el efecto de NaCl y manitol en callos embriogénicos de caña de azúcar, en donde vieron un aumento de los contenidos de prolina e la variedad susceptible además de verse un aumento en función de la concentración de agentes estresantes en el medio (Errabii et al., 2007). Además, se analizó la respuesta a nivel bioquímico y fisiológico de plantas de caña cv. IAC91-5155, sometidas a un déficit hídrico en el suelo, en donde se encontró que existe un aumento de osmoprotectores como prolina así como el disacárido no reductor de trehalosa (Queiroz et al., 2011). Por otro lado, se han buscado cultivares tolerantes a sequía y salinidad con base a mediciones fisiológicas y bioquímicas. Se evaluaron 13 cultivares con la finalidad de hallar aquellos que presentaran cierto grado de tolerancia ante diferentes dosis de PEG usando como indicador la acumulación de prolina. (Abbas et al., 2014).

Así mismo, el someter semillas a cierto estrés activa cierta tolerancia, esta práctica es conocida como halopriming. En caña de azúcar semillas cv. Co 86032 previamente expuestas a agentes estresantes, se germinaron para después ser sometidas durante 15 días a estrés salino por NaCl (150 mM) e iso-osmótico con PEG 8,000 ajustado a -0.7 MPa, en donde hallaron una mayor concentración de prolina en las plantas provenientes de semillas que no fueron expuestas ante agentes estresantes (Patade *et al.*, 2012).

Ahora bien, se conoce de otras moléculas que están implicadas en la osmoprotección, como por ejemplo la trehalosa, disacárido no reductos, glicina betaína, cisteína, pinitol, entre otros.

Cuadro 1 Resultados de búsquedas bioinformáticas de genes relacionados con osmoprotección Tomado y adaptado de (Barros *et al.*, 2011)

Clase de genes		Resultados de tBLASTn respecto SUCEST					Resultados por BLASTx	
		Gen	Clúster (tamaño nt)	E-value	ORF (aa)	Acceso al NCBI	ORGANISMO	E-value
Prolina	P5CS	Suc_P5SC_01(2627)	0	729	gi:34908290	Oryza sativa	0	score
	P5CR	Suc_P5CR_01(1050)	e93	243	gi:66356280	Zea mays	e135	1199
Trehalosa	TPS1	Suc_TPS1_01(410)	e114	201	gi:52353687	Oryza sativa	e125	483
	TPPB	Suc_TPPB_01(1287)	e96	262	gi:50945643	Oryza sativa	0	441
Glicina-Betaína	BADH	Suc_BADH_01(2101)	0	506	gi:50950101	Zoysia tenuifolia	e180	485
	CMO	Suc_CMO_01(1114)	e119	97	gi:112790161	Zea mays		946
Cisteína	OASTIL	Suc_OASTIL_01(1322)	e138	325	gi:758353	Zea mays	e162	634
	SAT	Suc_SAT_01_(1468)	e90	318	gi:349106886	Oryza sativa	e99	575
Myo-inositol	INSP1	Suc_INSP1_01 (2527)	0	510	gi:11762100	Zea mays	0	363

Relación de genes que codifican para la síntesis de osmolitos compatibles, resalta el hecho que estos genes se hallen en especies emparentadas con caña, como lo son arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*).

1.2.2 Polietilenglicol como agente inductor de estrés

La complejidad de estudiar *in situ* las respuestas desencadenadas por un estrés abiótico específico ha sido bien remarcada por diferentes grupos de investigación, debido a que pueden intervenir e incidir más de un tipo de estrés de manera simultánea. Como alternativa, una manera de simular estos estreses es utilizando sistemas de cultivo *in vitro*, con la finalidad de controlar y simular las condiciones de un estrés en particular. Por ejemplo, para estudiar los efectos del estrés osmótico se ha utilizado ampliamente el polietilenglicol (PEG). El polietilenglicol (PEG) es un polímero de cadena larga, inerte, no iónico ($\text{HOCH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$). De acuerdo a su peso molecular (PM) se clasifican en: PEG 1000 (950-1050 PM), PEG 4000 (3000-3700 PM), PEG 6000 (6000-7500 PM), PEG 8000 y PEG 20000 (15000-20000 PM) (Castro Montes 2008).

Una de las razones por las que este compuesto se usa en trabajos de fisiología ante el estrés osmótico es que no penetra las células cuando su peso molecular es alto (Steuter y Mozafar, 1981), además de que no presenta toxicidad para el tejido (Lawlor, 1970). La adición de PEG en un medio acuoso (g kg^{-1} de H_2O) disminuye negativamente el potencial hídrico, razón por la cual se ha sugerido que el potencial hídrico de la solución con PEG es resultado de las fuerzas matriciales de las subunidades oxido-etileno del polímero (Castro Montes 2008).

Ahora bien, se ha reportado que el PEG simula un estrés hídrico en sistemas de cultivo *in vitro* por lo que se puede utilizar para la selección de líneas tolerantes a estrés osmótico. Por ejemplo, en *Vigna aconitifolia* se usó con fines de caracterizar las respuestas bioquímicas ante el estrés simulado (Soni et al., 2011). Este compuesto reduce la porosidad de la pared celular; además de limitar la absorción de aluminio de las raíces secundarias y primarias en *Phaseolus vulgaris* L. (Yang et al., 2013); con base a lo antes mencionado, se reportó una relación estrecha entre la expansión de la pared celular y el ajuste osmótico a nivel radicular debido a la presencia de PEG 8 000. Con respecto a caña de azúcar, en algunos trabajos se ha hecho uso del PEG en callos embriogénicos para estudiar acerca del fenómeno de tolerancia cruzada (Munir y Aftab, 2009) así como para seleccionar líneas tolerantes (Rao y Ftz, 2013). Por otra parte, se estudió el contenido de macronutrientes en vitroplantas afectadas por la aplicación de PEG en el medio de cultivo (Castañeda et al., 2015).

1.2.3 Relaciones hídricas en la célula vegetal

El agua imprescindible como medio en el que se llevan a cabo reacciones bioquímicas dadas sus características particulares como su carácter polar, la formación de puentes de hidrógeno así como la fuerza de cohesión molecular, hacen que el agua sea de vital importancia para la supervivencia, crecimiento, desarrollo así como para el metabolismo de las plantas influyendo a nivel estructural de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos así como de estructuras celulares.

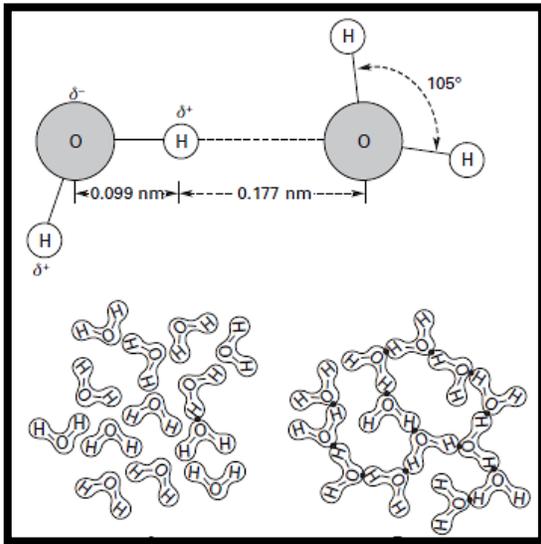


Figura 1.6 Representación esquemática de un par de moléculas de agua. (Tomado de Azcón-Bieto y Talón. 2008)

Se aprecia en el panel A) el puente electrostático basado en la naturaleza dipolo de la molécula, que está en función del exceso de carga positiva en el átomo de hidrógeno (H) y del exceso de carga negativa en el átomo de oxígeno (O). La unión molecular cuenta con una energía de 20 kJ mol⁻¹. Panel B) comportamiento de moléculas de agua a temperaturas de ebullición (100°C) y fusión (0°C) en las cuales los puntos negros denotan los puentes de hidrógeno.

Un aspecto a considerarse dentro de la fisiología vegetal es la facultad que poseen las moléculas de agua para desplazarse conocida como potencial hídrico (Ψ), el cual es una medida de la energía libre del agua en el sistema; la magnitud que rige los movimientos del agua y que por convención se ha usado para denotar el estado hídrico de la planta es el potencial químico (μ), que es la variación de la energía libre del agua en un punto en función a variaciones de moles de agua que entran o salen de este punto en donde parámetros como presión y temperatura permanecen constantes (Azcón-Bieto y Talón 2008).

Hecho que se concatena, desde la perspectiva celular con el flujo de agua. Prueba de ello es el proceso de ósmosis en el cual se transporta el agua por el simplasto de las plantas para mantener su contenido a nivel celular ya que en dos compartimientos con diferente potencial hídrico, separados por una membrana semipermeable, el agua se desplaza desde el compartimiento con un alto potencial hídrico hacia el de bajo potencial hídrico (Azcón-Bieto y Talón 2008; Rodríguez-Pérez, 2006).

Ahora bien, las diferencias en potencial hídrico permiten que se lleven a cabo procesos que promueve la homeostasis celular mediante el transporte de agua y otras moléculas entre células, tejidos y órganos tales como aminoácidos, carbohidratos y/o iones a favor de gradientes de potencial hídrico (Rodríguez-Pérez, 2006). A medida que se dan fluctuaciones en el contenido de agua o de solutos, suceden cambios a nivel citosólico debido a la concentración de solutos, lo cual origina respuestas como el ajuste osmótico así como la osmorregulación; el ajuste osmótico confiere una vía de mantenimiento del contenido de agua intracelular dado que la pérdida de agua incrementa la concentración de solutos en la célula (Azcón-Bieto y Talón 2008).

Otro aspecto a considerar en lo que a relaciones hídricas atañe es el conocimiento acerca de las acuaporinas, proteínas de membrana de entre 21 a 34 kD; las cuales facilitan el movimiento del agua entre membranas celulares. Se tratan de canales proteicos que regulan la absorción de agua al aumentar o disminuir el flujo hídrico por medio de apertura/oclusión (Azcón-Bieto y Talón 2008; Chaumont & Tyerman, 2014).

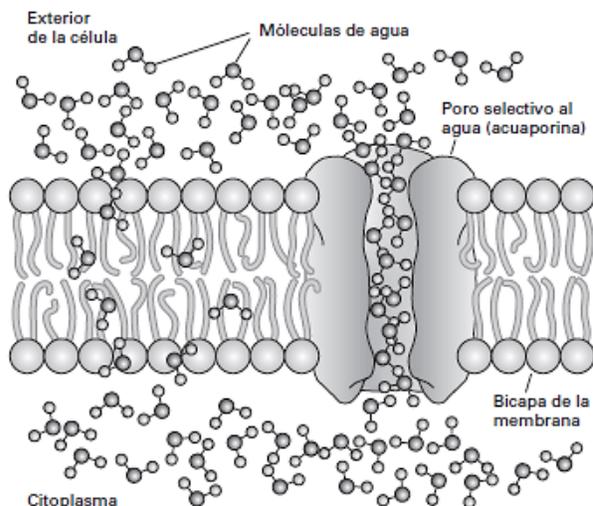


Figura 1.7 Movilización de moléculas de agua a través de la membrana. (Tomado de Azcón-Bieto y Talón. 2008)

En la figura se visualiza el paso de moléculas de agua a través de la membrana mediante el proceso de difusión de individual de moléculas entre la bicapa lipídica, otro aspecto a percibir es la difusión llevada a cabo mediante poros selectivos para moléculas de agua, conocidas como acuaporinas (proteínas de membrana), (Azcón-Bieto y Talón 2008).

Acorde con las relaciones hídricas, cabe destacar que el agua circula entre dos puntos siempre que el potencial termodinámico entre ellos sea distinto. El potencial hídrico comprende al trabajo que habría que ejercer a una unidad de masa de agua ligada al suelo, tejidos para transportarlos de ese estado de unión a un estado de referencia (correspondiente al agua pura) a misma temperatura y presión atmosférica (Azcón-Bieto y Talón 2008). Ahora bien, existe una reciprocidad entre el potencial hídrico y potencial químico, que se representa por la siguiente ecuación:

$$\Psi = \frac{\mu - \mu^{\circ}}{V}$$

En donde:

Ψ : potencial hídrico de la muestra

μ : potencial químico del agua en la muestra

μ° : potencial químico de referencia del agua

V : volumen molar del agua

Como aspecto historiográfico, el término “potencial” así como la terminología termodinámica aplicada a plantas fue propuesta por Tang y Wang (1941) unificándose hasta 1959; en donde el potencial de presión es positivo y expresa la presión ejercida por el protoplasto contra la pared celular lo cual cobra sentido ya que cuanto el agua entra en la célula, aspectos como el volumen de vacuola aumenta ejerciendo presión sobre las paredes (presión de turgencia); inmediatamente, se desarrolla de forma inversamente proporcional una presión desde las paredes al interior de la célula denominada presión de pared, la cual se comporta como una fuente de presión hidrostática acrecentando el estado energético del agua en la célula lo que representa, en su caso, el potencial de presión celular, el cual toma valores positivos siempre y cuando la vacuola imprima presión sobre las paredes adyacentes (Azcón-Bieto y Talón 2008).

Otro componente importante en la fisiología de la célula es el potencial mátrico, el cual es negativo y enuncia el efecto de elementos como los microcapilares y las superficies de las paredes así como de componentes celulares en la retención de agua, en donde este potencial se genera debido a la incidencia de fuerzas que retienen moléculas de agua por

efecto de la capilaridad, adsorción así como hidratación en la matriz celular compuesta por la pared celular y citoplasma; dado que las microfibras celulósicas crean intersticios en los que moléculas de agua quedan retenidas y, en citoplasma, e agua es adsorbida en coloides y macromoléculas (Azcón-Bieto y Talón 2008).

Dada la convención de los términos, en determinado sistema, el potencial hídrico total es la adición algebraica de varios elementos tales como se muestran a continuación (Bustamante, 1986; Azcón-Bieto y Talón, 2008):

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_m + \Psi_g$$

En donde:

Ψ_p : Potencial de presión que denota la diferencia en la presión hidrostática con la referencia, pudiendo ser positivo o negativo.

Ψ_s : Potencial osmótico está en función de solutos disueltos disminuyendo la energía libre del agua tendiendo a ser siempre negativo

Ψ_m : Potencial mátrico, el cual resulta de la acción conjunta de fuerzas de adsorción y capilaridad, las cuales atraen y retienen agua en el suelo reduciendo su energía potencial por debajo de la energía potencial del agua libre.

Ψ_g : Potencial gravitacional deriva de las diferencias de energía potencial debido a la diferencia de altura con el nivel de referencia.

Siendo específicos, el potencial hídrico en las células vegetales está mediado por el potencial osmótico (**Ψ_s**) y por el potencial de presión (**Ψ_p**) en donde el **Ψ_s** es negativo y denota el efecto de los solutos en la disolución celular; considerando una pared elástica, el citoplasma con los organelos así como la vacuola la cual contiene moléculas en disolución (azúcares, iones, entre otros) y que puede ocupar un 80% del volumen total de la célula, los intercambios de agua a nivel celular se rigen por la vacuola. El potencial osmótico está en función de la concentración de sustancias osmóticamente activas en la vacuola el cual es idéntico a la presión osmótica del jugo vacuolar. En una célula vegetal **Ψ_s** siempre poseerá valores negativos los cuales son mediados por el volumen celular, siendo próximas a cero en células hidratadas contrastando con las deshidratadas.

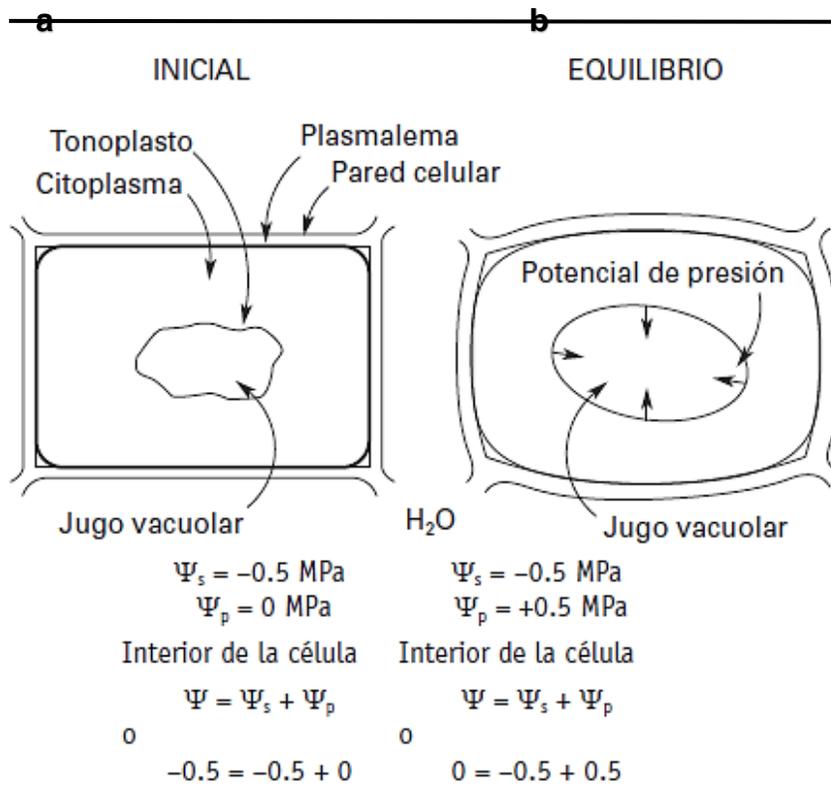


Figura 1.8 Desplazamiento compartimentado de moléculas de agua. (Tomado de Azcón-Bieto y Talón. 2008)

En la figura se aprecia como los intercambios de agua celular están controlados por la vacuola, en donde el movimiento del agua entre los compartimentos de la célula en agua pura con un $\Psi = 0$, siendo el Ψ_s de jugo vacuolar de -0.5 MPa . Panel a) se aprecia una célula con un $\Psi = 0$ en condiciones normales; b) célula con $\Psi = -0.5 \text{ MPa}$ en donde existe una presión considerable que modifica la morfología vacuolar.

1.2. 4 Relevancia del ácido abscísico (ABA) en respuesta a estrés.

Identificada en la década de 1960 al realizarse estudios sobre la abscisión de frutos y dormancia de yemas en algodón, se aisló la molécula abscisina II (UUU). El ácido abscísico (ABA) se ha asociado con aspectos la regulación de crecimiento, dormancia de semillas, germinación, entre otros, así como su respuesta ante estímulos ambientales como sequía, salinidad, baja temperatura (Jordán y Casaretto, 2006)

Se conoce que ABA es sintetizado a través de la escisión oxidativa de un 9-*cis* epoxicarotenoide (C40) para producir xantoxina (C15) en los plastidios, posteriormente sucede la conversión del intermediario xantoxina a ABA a través de la vía ABA aldehído en el citoplasma (Rai et al., 2011); la epoxidación de zeaxantina y antraxantina (precursores 9-*cis*- epoxicarotenoides) a violaxantinas es considerado el primer paso en la vía biosintética de ABA el cual es catalizado por una zeaxantina epoxidasa (ZEP); la violaxantina sufre una modificación mediante *cis*-isomerasas y sufre una conversión en 9-*cis*-epoxicarotenoide, posteriormente la 9-*cis*-neoxantina es catalizada por la enzima 9-*cis* epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) para producir un intermedio C15, llamado xantoxina la cual es enviada al citosol donde es convertida en AB-aldehído por una alcohol deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (DEG), siendo el último paso de la vía que el ABA-aldehído es oxidado a ABA por la enzima ABA-aldehído oxidasa (Rai et al., 2011).

Durante el crecimiento vegetativo, el ABA (ácido abscísico) es la principal hormona que confiere tolerancia al estrés abiótico, fundamentalmente a la salinidad y la sequía (Hossain *et al.*, 2010). El ABA se produce bajo condiciones de déficit de agua y juega un papel importante en la respuesta al estrés y tolerancia de las plantas a la sequía y salinidad alta, por lo cual la aplicación exógena de ABA induce un número de genes que responden a la deshidratación y el estrés por frío (Zhu, 2002; Shinozaki et al., 2003).

Se conoce que la salinidad, así como la sequía y las bajas temperaturas causan un incremento en la biosíntesis y acumulación del ABA, pues activan genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de esta hormona, las que pueden ser catabolizadas al terminar el periodo estresante (Chávez y González, 2009).

En condiciones de sequía, las concentraciones de ABA en la hojas se incrementan; este incremento del ABA actúa como una molécula señal que su traducción de la señal inicial se amplifica hasta activar otra cascadas de señalización (Chávez y Ramírez 2010).

La hormona ABA, posee la facultad de regular procesos que responden a estímulos estresores como sequía, salinidad y bajas temperaturas. Durante la sequía, las alteraciones de ABA en el transporte de iones en células guarda desencadena un cierre estomático, estrategia que reduce la pérdida de agua por transpiración (Li *et al.*, 2000). Procesos mediado por los cambios en el potencial de membrana y flujo de iones, lo cual altera la turgencia de las células oclusivas causando su cierre (Cutler *et al.*, 2010).

En circunstancias de estrés osmótico, varios genes son activados mediando así una tolerancia a dicho escenario desfavorable, además de que existen cambios en los niveles del ABA (Yoshida *et al.*, 2014). Ahondando en la expresión génica en respuesta a estrés del tipo osmótico, se ha demostrado que este se encuentra mediado por la vía dependiente e independiente de ABA en donde son activados ciertos factores de transcripción; (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

De manera puntual, los elementos que desempeñan un papel relevante en la vía dependiente de ABA son los que actúan en *Cis*, conocidos elementos de respuesta a ABA (del acrónimo en inglés ABRE, ABA-responsive element), así como factores de transcripción tipo AREB/ABFs (del acrónimo en inglés ABRE-binding protein/ABRE-binding factors). Por otra parte, en la vía independiente de ABA, los elementos en *Cis*, tales como los elementos responsivos a deshidratación (DRE/CRT, del acrónimo en inglés dehydration-responsive element/C-repeat) además de los factores de transcripción DREB2 (del acrónimo en inglés dehydration-responsive element/C-repeat-binding protein 2) (Yoshida *et al.*, 2014) son los principales factores.

1.3 Clasificación Taxonómica de *Saccharum officinarum* L

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una gramínea perteneciente a la familia *Poaceae*, por lo cual su apariencia general se asemeja otros tipos de pastos; siendo una de las plantas de mayor eficiencia fotosintética. De crecimiento amacollado y de propagación vegetativa, la planta alcanza la madurez en aproximadamente 12 meses, alcanzado 5 metros de altura y su diámetro varía entre los 2.5 y 7.5 cm. Se pueden cosechar entre cuatro y seis veces el mismo cultivo antes que la producción comience a ser insostenible (D'Hont et al.2008). Se trata de una especie que, al igual que las otros representantes con metabolismo C4, se encuentran entre las más importantes a nivel mundial ya que proveen de materia prima al sector agrícola, alimentario y bioenergético (Rao et al., 2016).

Cuadro 1.2 Clasificación taxonómica de *Saccharum officinarum* L. (Tomado y adaptado de Bertoncini *et al.*, 2006).

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Tribu	<i>Andropogoneae</i>
Género	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>S. officinarum</i>

1.3.1 Importancia económica

En términos de producción mundial, nuestro país se ubica en la sexta posición con 6.1 millones de toneladas durante la zafra 2015-2016 (véase figura I. V) las cuales fueron producidas en una extensión de 778,930 ha (CONADESUCA, 2016). En este contexto, la agroindustria azucarera representa el 0.5% del Producto Interno Bruto (PIB), 2.5% del sector manufacturero y cerca del 11.5% del sector primario suministrando de empleo a tiempo completo y temporalmente a cerca de 2.2 millones de personas (Aguilar-Rivera, et al., 2016; Sentíes-Herrera et al., 2014)

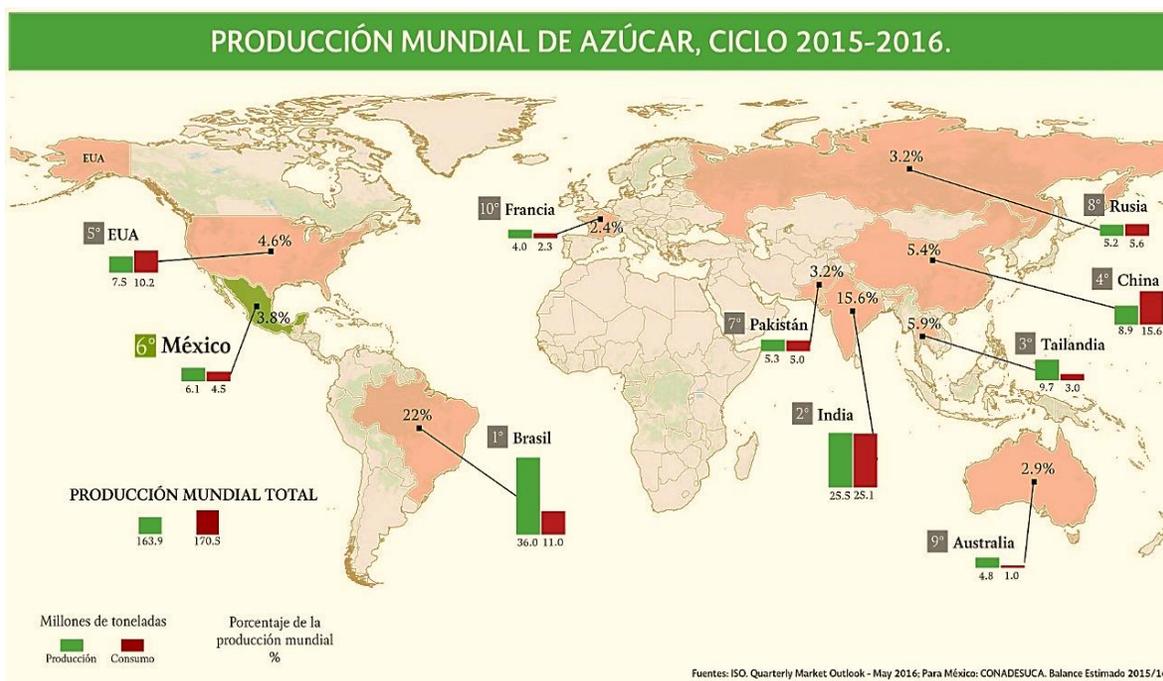


Figura 1.9 Producción mundial de caña de azúcar en el ciclo 2015-2016. Iso. Quarterly Market Outlook –May 2016; para México: CONADESUCA. Balance estimado 2015/2016. (Tomado de: <http://www.gob.mx/conadesuca>).

En la figura se enlistan los principales países productores de caña de azúcar en donde se visualizan en forma de barras de color verde la producción y en barras de color rojo el consumo, ambos datos son en millones de toneladas (MT).

El cultivo de caña de azúcar es de importancia a nivel nacional ya que genera una derrama económica en 227 municipios de 15 estados de la república, dicha actividad se desarrolla en 664 mil hectáreas que dan suministro a 57 ingenios azucareros (Sentíes-Herrera *et al.*, 2014); no obstante, las consecuencias del cambio climático originarán sequías fuertes y

prolongadas, con lo cual se pronostica un entorno adverso para la producción mundial de este cultivar (Cha-um and Kirdmanee, 2008; Zhao and Li, 2015). Tomando como antecedentes que nuestro país ha sufrido los embates de sequías viéndose afectadas grandes extensiones agrícolas y comunidades rurales desestabilizando la economía local y nacional (Ortega-Gaucin et al., 2016); por lo cual es necesaria la generación de conocimiento para hacer frente a tales amenazas.

En este sentido el cultivo de caña de azúcar es afectado por estreses abióticos tales como la sequía, la cual es el mayor limitante para la producción a nivel mundial (Tammissola, 2010). Proyecciones acerca del impacto que tendrá la sequía, señalan un déficit en la producción por arriba del 25% para el año 2080 de no adoptarse políticas y estrategias para sortear los efectos de la sequía, (Moyer, 2010; Esperón-Rodríguez et al., 2016).



Figura 1.10 Regiones Cañeras de México. CONADESUCA 2016 en: <http://www.gob.mx/conadesuca>.

Se ilustran en función de su ubicación en el territorio nacional, las zonas productoras que van desde la zona sureste que comprende los estados de Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Chiapas en coloración verde, pasando por la región Córdoba-Golfo de coloración ocre, que incluye el estado de Oaxaca así como parte del estado del estado de Veracruz,

en específico la zona de Córdoba; la región Papaloapan-Golfo que está representada por la parte centro-sur del estado de Veracruz; la región centro que está etiquetada de color rosa que incluye el estado de Puebla así como la zona central del estado de Veracruz, la cual da paso a la región noreste, de color marrón, que está representada por el norte de Veracruz, y los estado de Tamaulipas y San Luis Potosí.

La región pacífico, en tonalidad aguamarina, se halla representada por los estados de Michoacán, Jalisco y Colima. La región norte está representada por los estados de Sinaloa y Nayarit en color amarillo.

1.3.2 Cultivo *in vitro* en caña de azúcar

Además de lo antes mencionado, para enfrentar estos escenarios adversos es necesario implementar, como se mencionó en líneas anteriores, conocimiento y técnicas que permitan salvaguardar o incrementar la producción de la industria azucarera, siendo el manejo y conservación de recursos fitogenéticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) la piedra angular para la creación, implementación y desarrollo de programas de mejoramiento genético (Flores, 2001), de tal forma que el cultivo de tejidos vegetales permite la consecución de tal fin (Pence *et al.*, 2002).

En ese sentido, existen trabajos relacionados con el cultivo *in vitro* de caña de azúcar de variedades de importancia nacional como el de Rangel Estrada *et al.*, 2016; desarrollando protocolos de micropropagación vía organogénesis directa de las variedades ITV 92-1424, Laica 82-2220 y Q28-2. Por otra parte, Bello-Bello *et al.*, 2014, consiguió la conservación fitogenética a través de paclobutrazol, compuesto químico perteneciente al grupo de los triazoles, el cual retarda el crecimiento vegetal al bloquear la síntesis de ácido giberélico.



Figura 1.11 Plántulas de caña de azúcar obtenidas por cultivo *in vitro*. A) Aclimatación; B) Trasplante en campo. Tomada de Bello-Bello *et al.*, 2014

En la imagen se visualizan vitroplantas en su estado de aclimatación *ex vitro* así como el porte y crecimiento de éstas respecto a su trasplante en campo y condiciones reales en donde se aprecia su desarrollo.

Actualmente, se cuentan con investigaciones que versan acerca de los genes en respuesta a factores abióticos tales como la sequía, los cuales se enfocan a nivel tejido específico en hojas (Lembke *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2009); sustancialmente, con el uso e implementación de metodologías novedosas se han podido identificar genes en respuesta a estrés por sequía, los cuales se han usado para mejorar la tolerancia ante estrés para así aumentar la productividad del cultivo (Begcy *et al.*, 2012).

1.3.4 Sobre la implementación de herramientas transcriptómicas en plantas

Las plantas tienen una rica complejidad y diversidad bioquímica; con la deducción de vías bioquímicas usando enfoques genómicos en donde los genes, genomas y/o transcriptomas son examinados y relacionados filogenéticamente para revelar secuencias conservadas y asociadas con fenotipos diferenciados incluyendo metabolitos; aunado a esto, la anotación funcional, perfiles de expresión y filogenia, pueden brindar información en cuanto a la evolución de rutas bioquímicas y sus metabolitos derivados entre reinos vegetales (Góngora y Buell, 2013), ya que con el surgimiento de las herramientas de secuenciación masiva, se hizo más asequible el trabajar con plantas no modelo, como *S. officinarum* L.

Ahora bien, se entiende por transcriptoma al conjunto completo o total de las transcripciones de una célula (Nagalakshmi *et al.*, 2010); y por otra parte, se define como transcriptómica al estudio del transcriptoma de una célula, células o un organismo (Morozova *et al.*, 2009). En retrospectiva, se han desarrollado tecnologías que permitan la caracterización de transcriptomas, tales tecnologías varían desde la secuenciación tipo Sanger hasta los microarreglos (Nagalakshmi *et al.*, 2010)

Con la llegada de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, se ha revolucionado el análisis de transcriptomas (Morozova-Marra, 2008), en donde el método RNA-Seq echa mano de la tecnología de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing) para secuenciar ADN a partir de ARNm, con altos rendimientos. RNA-Seq ofrece un panorama global de la estructura transcripcional así como de los niveles de expresión de los transcritos (Nagalakshmi, *et al.* 2008; Wang *et al.*, 2009).

Hoy por hoy, las tecnologías de secuenciación de nueva generación, por ser ya asequibles y por los datos generados, ofertan el realizar un transcriptoma *de novo* de un organismo aun sin contar con un genoma de referencia, siendo Illumina^R la plataforma más usada en función de la calidad, cantidad y costos (Bankar *et al.*, 2015).

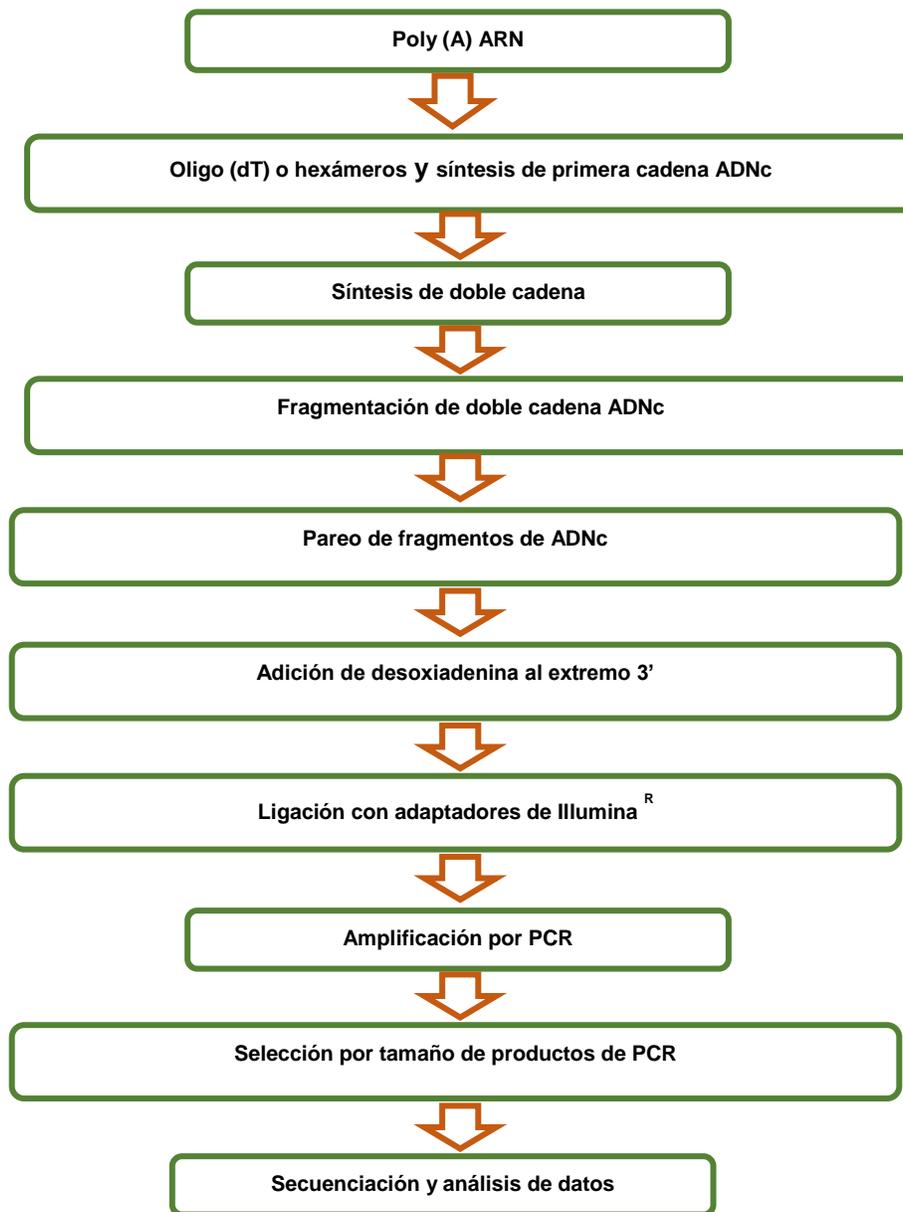


Figura 1.12 Diagrama de flujo de pasos implícitos en método RNA-seq. Tomado y modificado de (Nagalakshmi et al., 2010)

Al presente, existen dos formas en lo que respecta al ensamblado de secuencias:

- 1) Ensamblado *de novo*: intenta reconstruir la secuencia de ADN completa a partir de las lecturas sin ningún tipo de conocimiento previo sobre el genoma a ensamblar, en llanas palabras carece de genoma de referencia. Busca lecturas cuyo final

coincida con el principio de otra de tal manera que se puedan aparear para formar fragmentos mayores hasta completar el genoma.

- 2) Ensamblado comparativo: se basa en un genoma secuenciado con antelación, (genoma de referencia) que se supone sea similar al que se quiere ensamblar. El mecanismo básico trata de colocar cada una de las lecturas en la posición adecuada utilizando el genoma referenciado como guía.

Cabe señalar que en el ensamblado *de novo*, los algoritmos se agrupan en tres categorías: Overlap-Layout-Consensus (OLC), grafos de Brujín (DBG) y los grafos greedy que pueden usar OLC o DBG. Grosso modo, para realizar un análisis transcriptómico se parte de la obtención de RNA a partir de tejidos y/o tratamientos, posteriormente se hace la agrupación de los tejidos (hojas, raíces, tallos, flores, frutos, etc.) los cuales serán usados para crear la referencia de la biblioteca de ADNc.

Las bibliotecas son secuenciadas usando lecturas cortas en plataformas de secuenciación de próxima generación (NGS). La biblioteca de ADNc se secuencia en el modo de extremos apareado (Paired End), siendo que las bibliotecas experimentales son secuenciadas por único extremo (Single End). Las lecturas son luego procesadas por su calidad. Un inicial ensamble *de novo* es hecho únicamente usando las lecturas de la biblioteca de referencia (PE). Un genoma artificial se puede construir *de novo* a partir de la unión de las transcripciones representativos (las isoformas de mayor longitud dentro de cada locus) en un genoma artificial; para filtrar secuencias redundantes, las lecturas del tipo SE de bibliotecas experimentales se mapean con respecto a la pseudomolécula usando TopHat (Trapnell *et al.*, 2009).

Las nueva lecturas del tipo SE (secuencias no mapeadas) son recopiladas, siendo incluidas dentro de un segundo ensamble final por el ensamble de ambos extremos apareados y las lecturas cortas no mapeadas del tipo SE. La abundancia de la expresión de bibliotecas experimentales individuales son calculadas por el mapeo de las lecturas del tipo SE usando TopHat al genoma artificial, se cuantifica la abundancia de expresión usando Cufflinks (Trapnell *et al.*, 2010). Las abundancias de expresión son expresadas en valores FPKM (Fragmento por kilobase por millón de lecturas apareadas).

La anotación funcional es asignada a los transcritos en el ensamble *de novo* por similitud de secuencias a través de búsquedas en BLAST (Altshul, 1990) contra UniRef (Base de datos referenciada) (Huang *et al.*, 2007) (Finn *et al.*, 2008).

1.3.5 Sobre algunos estudios de genómica funcional en *Saccharum officinarum* L.

En virtud de los efectos de estreses abióticos en la agricultura en lo que respecta a producción (Rodríguez et al., 2006) caña de azúcar se ve afectada mostrando un retraso su crecimiento de alrededor del 50%. Para mantener y asegurar la producción de éste cultivar es necesario hacer frente a desafíos como tolerancia a estreses bióticos y abióticos así como manejo de nutrientes siendo necesarios la integración de métodos de mejoramiento convencionales con métodos biotecnológicos para superar limitaciones (Suprasanna et al., 2011). Razón por la cual es necesario hallar y estudiar sobre genes en caña de azúcar asociados con rasgos tales como la acumulación de sacarosa, rendimiento de biomasa y aquellos que confieren tolerancia ante los diferentes tipos de estreses, investigaciones que subyacen principalmente en estudios transcriptómicos (Mishra, Tuteja, & Tuteja, 2006). Actualmente se tiene la necesidad de desarrollar variedades tolerantes a sequía que posean un consumo eficiente de agua futuro (Prabu y Kavar, 2011).

En caña de azúcar se han llevado a cabo trabajos encaminados a mejorar esta especie con miras a incrementar la producción en términos de cantidad y rendimiento de biomasa, crear cultivares tolerantes diversos tipos de estrés, entre otros. En ese sentido, se han usado EST (Expressed sequence tag), marcadores de secuencia expresada que básicamente son subsecuencias de una secuencia nucleotídica transcrita. Por ejemplo, la colección de EST derivada del proyecto SUCEST consta de 237,954 EST's los cuales fueron reorganizados en 43,141 transcritos putativos, de tal manera que han sido referidos como secuencias ensambladas de caña de azúcar (SAS's) (Vettore et al., 2003). Posteriormente se llevó a cabo una organización minuciosa de los genes en categorías funcionales tales como: componentes de transducción de señales, regulación de la expresión génica, desarrollo, respuesta a estrés biótico y abiótico, metabolismo, entre otros (Vettore et al., 2003); lo cual representó la base para la investigación desde la perspectiva de la genómica funcional (Menossi, *et al.*, 2008).

Estudios realizados con tecnologías tales como macro y microarreglos han sido usados para la identificación de genes expresados específicamente en tallos, en respuesta ante enfermedades y aquellos involucrados en metabolismo de carbohidratos (Casu *et al.*, 2005; Grivet *et al.*, 2001; Ulian 2000,); así como en el caso de Papini-Terzi et al., 2009 en donde relizaron la evaluación de treinta genes en genotipos con diferentes niveles de grados Brix.

Bajo el enfoque tipo EST (Expressed Sequence Tag), mejor conocido como marcador de secuencia expresada, que no es más que una pequeña subsecuencia de una secuencia nucleotídica transcrita (que puede codificar o no para una proteína), el cual se puede utilizar para la identificación y descubrimiento de genes así como para la determinación de secuencias de interés (Kerlavage, 1991), se han realizado trabajos que han contribuido al descubrimiento de genes de importancia (Prabu-Kawar, 2011), otros trabajos que atañen al estudio de librerías de EST de secuencias tejido-específico de variedades subtropicales de caña (*cv Cos 767*) se hallaron 25 grupos relacionados con estrés hídrico mostraron dos veces mayor expresión relativa durante 9 horas ante deshidratación (Gupta, *et al* 2010).

Además, se ha logrado la identificación y caracterización de un gene que codifica para la expresión de una proteína inducible en respuesta a sequía (Sugiharto *et al.*, 2002), así como el análisis de la integración de transgene específico, así como la selección de genes de referencia en caña de azúcar, aunado a la validación de nuevos genes de referencia por RT-qPCR (Lane, *et al.*, 2011), además se reportó la evaluación de perfiles de expresión de 1,545 genes en plantas expuestas a sequía, carencia de fosfato, metil jasmonato, ácido abscísico herbivoría, y ante exposición de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno (Rocha *et al.*, 2007), aunado a lo antes descrito, 1670 genes se expresaron diferencialmente en plantas de caña expuestas a estrés hídrico (Rodrigues *et al.*, 2011).

Actualmente, se ha reportado un ensamble *de novo* de 6 genotipos con características agronómicas importantes usando la tecnología RNA-seq y la plataforma Illumina^R, trabajo en el cual se hallaron 400 millones de lecturas las cuales fueron ensambladas en 72,269 unigenes (Cardoso-Silva *et al.*, 2014).

JUSTIFICACIÓN

Dada la explosión demográfica y el calentamiento global, es un reto y necesidad el lograr una producción agrícola sustentable (Brown 2008; Turner et al., 2009), siendo una alternativa el aumentar el rendimiento de especies vegetales cultivables mediante el diseño de variedades mejoradas a través de la comprensión molecular de aspectos tales como genes, genomas, redes reguladoras inherentes al crecimiento, desarrollo y/o tolerancia ante estrés abiótico (Takeda y Matsuoka 2008).

El cultivo de caña de azúcar (*S. officinarum* L.) se encuentra expuesto a diferentes tipos de estreses ambientales que afectan su metabolismo y crecimiento impactando directamente en su producción. Una de las estrategias para hacer frente a estos problemas agrícolas subyace en hallar genes con potencial biotecnológico, motivo por el cual se pretende lograr esto con un ensamble *de novo* de la variedad *MEX 69-290* echando mano de la tecnología RNA-Seq (RNA Sequencing).

El análisis del transcriptoma aportara conocimientos acerca de aspectos moleculares y fisiológicos en caña de azúcar en respuesta al estrés osmótico, razón por la cual, se espera que éste trabajo provea de recursos integrales para la identificación de nuevos genes candidatos con amplio potencial que confieran tolerancia ante estrés osmótico.

HIPÓTESIS

El análisis transcriptómico así como los estudios fisiológicos en plantas cultivadas *in vitro* y sometidas a estrés osmótico permiten conocer las rutas, redes moleculares así como la respuesta fenotípica en este cultivo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el transcriptoma de plantas cultivadas *in vitro* de *Saccharum officinarum* L. cv *mex* 69290 sometidas a estrés osmótico.

Objetivos específicos

Evaluar parámetros bioquímicos (contenido de prolina) y fisiológicos (contenido relativo de agua, eficiencia fotosintética, tasa de transpiración, potencial osmótico) de las vitroplantas de caña de azúcar en estrés osmótico.

Generación y ensamble de un transcriptoma de caña de azúcar.

Identificar transcritos diferenciales de manera masiva mediante el análisis bioinformático del transcriptoma.

Cuantificar cambios en la expresión de ciertos genes bajo condiciones de estrés mediante RT-qPCR.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr el cumplimiento de los objetivos, se realizó el diseño experimental como a continuación en tres partes con la finalidad de esquematizar de manera simplista los principales pasos realizados durante la investigación (figura 2.5).

1.- En la primera parte echamos mano vitroplantas de la variedad *MEX 69290* de aproximadamente 3 meses de edad, sembrándose 8 vitroplantas en cajas magenta con 50 mL de medio MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) adicionadas con PEG 8000 (Sigma-Aldrich) el cual se ajustó a un potencial osmótico a -4.5 MPa que contenía algodón estéril como una matriz que permitiera a las plantas permanecer erectas por periodos de 24 a 72 horas bajo estrés osmótico. Al final de cada tratamiento, se realizaron mediciones de parámetros fisiológicos, tales como la tasa de la eficiencia fotosintética; tasa de transpiración, contenido relativo de agua, potencial osmótico y, finalmente, la cuantificación de prolina como un indicador bioquímico de respuesta ante estrés. **(Véase sección II.3)**

2.- Para la segunda sección, se realizó la extracción de ARN total, para las bibliotecas así como para la realización de la validación por RT-qPCR. **(Véase sección II.3).**

3.-En la tercera sección concerniente a la validación del transcriptoma, se seleccionaron 5 unigenes al azar (*SWT6a*, *NAC025*, *STK*, *ABIP3* y *PIP2*) los cuales fueron probados por RT-qPCR. **(Véase sección II.3).**

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

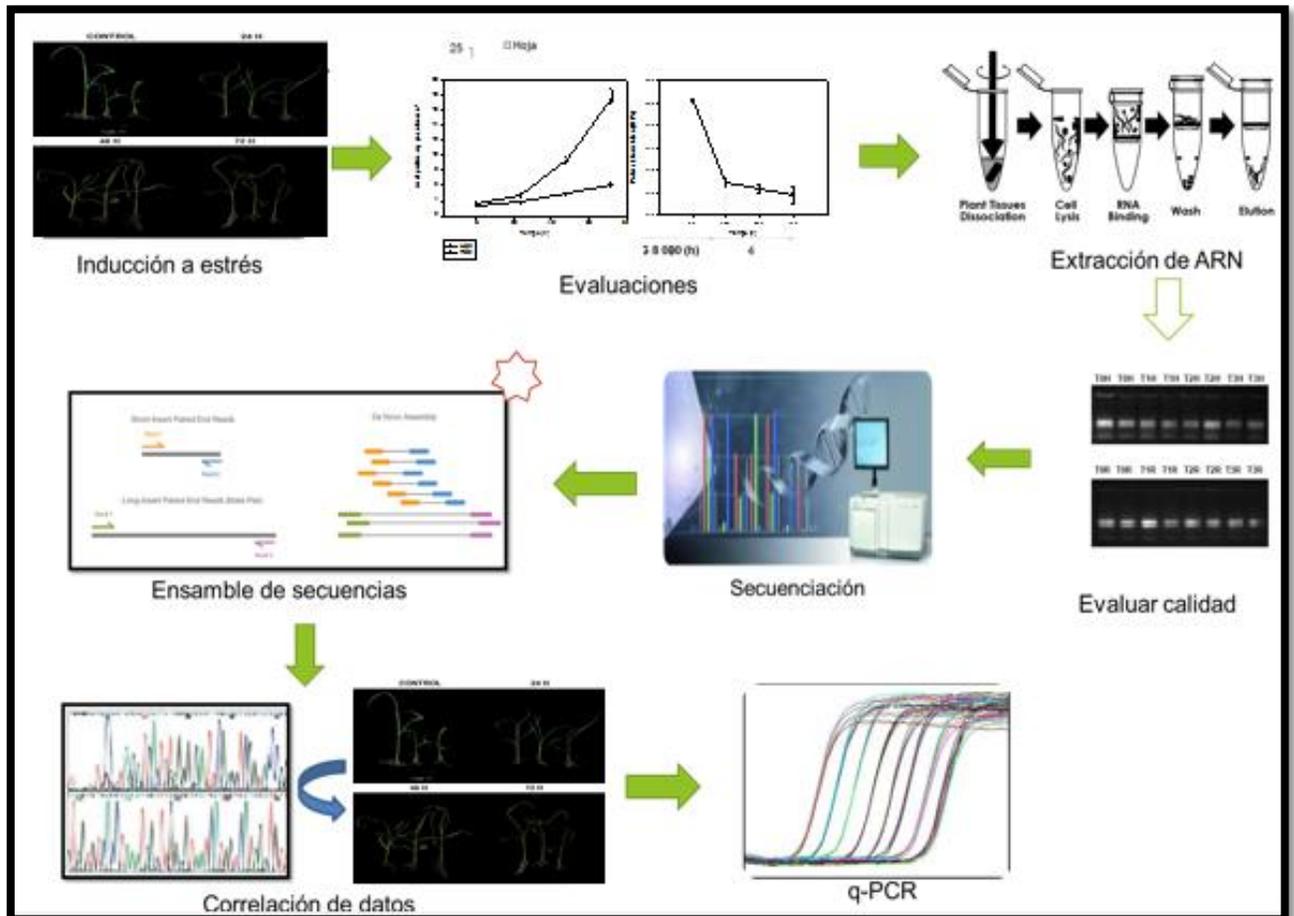


Figura 1.13 Esquematización de la estrategia experimental general.

Se partirá inicialmente de vitroplantas sometidas a gradiente de estrés a las cuales se les harán mediciones fisiológicas, de tal forma que después de realizar la fenotipificación se realizará la extracción de ARN para realizar el proceso de secuenciación. Posteriormente se llevará a cabo el análisis transcriptómico para luego hacer una correlación de los datos obtenidos a partir de la anotación del transcriptoma. Finalmente se realizará la validación de los datos mediante el análisis de la expresión génica por RT-qPCR.

CAPÍTULO II ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE *Saccharum officinarum* L. SOMETIDAS A ESTRÉS OSMÓTICO

2.1 INTRODUCCIÓN

Constantemente las plantas se hallan en entornos cambiantes en donde el estudio de las respuestas ante diferentes escenarios como lo son la salinidad y la sequía son necesarios dado que afectan el desarrollo y de especies de importancia económica. Reportes indican la afectación de estos estreses en tierras arables en un 10% aproximadamente, de tal forma que en algunos casos se ha cuantificado la afectación en un 50% en ciertos cultivos. (Bartels y Sunkar, 2005). De ahí la necesidad de entender las respuestas que acompañan al proceso de adaptación y tolerancia ante escenarios adversos.

Las respuestas morfológicas de las plantas en respuesta a estrés abiótico son diversas como el cierre de estomas, reducción de crecimiento, (Medeiros et al., 2013), pérdida de turgencia (Hayat et al., 2012), pérdida del contenido relativo de agua (Pandey y Agarwal, 1998). Dichas respuestas están en función de reacciones a nivel bioquímico que median la expresión génica. Por ello, el realizar un reconocimiento del fenotipo sometido a estrés, permitirá llevar a cabo una correlación con datos bioquímicos y moleculares permitiendo así la identificación de respuestas de manera por parte de la planta de una manera integrativa.

Por ende, en el presente apartado se pretende dilucidar las respuestas a nivel fenotípico, fisiológico y bioquímico de las plantas expuestas a estrés mediante el uso de herramientas y técnicas que permitirán correlacionar los datos con las respuestas moleculares.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico

Para la realización de éste apartado, se utilizaron vitroplantas de la variedad *MEX 69290* de aproximadamente 3 meses de edad, las cuales fueron resembradas en medio MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) adicionadas con PEG 8000 (Sigma-Aldrich) ajustando el potencial osmótico a -4.5 MPa que contenía algodón estéril como una matriz que permitiera a las plantas permanecer erectas. Cabe resaltar que se colocaron 8 vitroplantas en cada magenta, de tal forma que cada tratamiento constaba de 3 cajas magentas, los cuales variaron en función del tiempo de exposición al medio con PEG 8000, partiendo de 0, 24, 48 y 72 horas respectivamente.

2.2.2 Mediciones fisiológicas y bioquímicas en vitroplantas de *S. officinarum* L. sometidas a estrés osmótico

Para obtener información acerca de las respuestas fisiológicas de las vitroplantas en respuesta a estrés osmótico, se realizaron mediciones de parámetros fisiológicos, tales como la tasa de la eficiencia fotosintética; tasa de transpiración, contenido relativo de agua, potencial osmótico y, finalmente, la cuantificación de prolina como un indicador bioquímico de respuesta ante estrés.

2.2.3 Medición de tasa fotosintética neta y de tasa de transpiración

La tasa fotosintética neta fue determinada usando un sistema portable de fotosíntesis (Li-6400, Lincoln, Nebraska, USA), usando tres muestras biológicas por cada tratamiento, las lecturas fueron determinadas durante los primeros 60 segundos de haber cerrado la cámara.

2.2.4 Relaciones hídricas

A lo largo del tratamiento de estrés osmótico, el estado de agua de la planta se determinó midiendo el potencial osmótico (Ψ) de hojas expandidas de vitroplantas, usando un psicrómetro (HR-33T, Dew point, microvoltímetro, con cámaras del tipo c-52; Wescor, Logan, Utha, USA). Por otro lado, el contenido relativo de agua en hojas fue realizado con base a mejoras realizadas por lo reportado por Barrs *et al* 1962.

2.2.5 Software y paquete estadístico

Para proveer de soporte estadístico al presente trabajo, se realizó para cada tratamiento, la prueba HSD de Tuckey (Diferencia de Significancia Honesta; $p < 0.05$) usando el software STATGRAPHICS Centurion XVI.I, siendo que para el diseño y creación de los gráficos se utilizó el software SigmaPlot 11.0

2.2.6 Determinación del contenido de prolina

El contenido de prolina en hojas y raíces fue realizado, de acuerdo con el protocolo reportado por Gibon *et al* (2000) con ciertas modificaciones. Brevemente se pesaron 50 mg de tejido macerado (hoja y raíz) fueron colocados respectivamente dentro de tubos eppendorf con 500 μ L de etanol al 70% (v/v), después fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, después. A 50 μ L el sobrenadante se le agregaron 100 μ L de solución de ninhidrina 1% (v/v) en 60% (v/v) de ácido acético. Después de homogenizar, la mezcla fue llevada a 95°C durante 20 minutos (baño térmico), posteriormente, las muestras se dejaron enfriar en hielo para luego centrifugarse a 2,500 rpm durante 1 minuto a 4°C, finalmente y después de la separación de fases usando tolueno, se midió la absorbancia a 520 nm.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Fenotipificación y medición de parámetros fisiológicos y bioquímicos de vitroplantas de *S. officinarum* L bajo condiciones de estrés osmótico

Como parte medular de la investigación, se realizó la fenotipificación de vitroplantas con el agente estresante PEG 8000. Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas fisiológicas y bioquímicas para después, realizar la extracción de ARN total en hojas y raíces. Estas actividades se llevaron a cabo estudiar, desde la perspectiva fisiológica y bioquímica, el comportamiento de vitroplantas de caña en condiciones estresantes.

Como parte del proceso de fenotipificación, se visualizó que las vitroplantas sometidas a estrés por 24 horas presentaba un encogimiento leve de las hojas pero no así de la zona radicular. A las 48 horas el daño era ya considerable dado que el tallo y raíces presentaban signos de necrosis así como de un leve atisbo de clorosis a la altura de los ápices foliares. A las 72 horas de exposición a estrés, las vitroplantas habían perdido considerablemente la turgencia al caer en un punto irreversible de marchitez apreciándose una clorosis muy marcada a la altura de los primordios foliares además de cierto grado de necrosis en la sección basal pseudotallo. Otro aspecto notable estriba en el daño a la radícula, la cual se apreciaba marchitado.

Cabe resaltar zonas de la planta como radícula, sección basal del pseudotallo así como los ápices, presentaban pérdida de turgencia, cambios de coloración, y en el caso de raíces, un cambio en el volumen de la corona. Presumiblemente debido a reacciones del tipo fisiológico-bioquímico empeñadas en para recuperar la homeostasis celular. Las reacciones abarcan cambios que median la apertura y cierre de estomas, intercambio gaseoso, el contenido relativo de agua dentro de los tejidos así como la síntesis de osmolitos compatibles para la restauración de la turgencia celular.

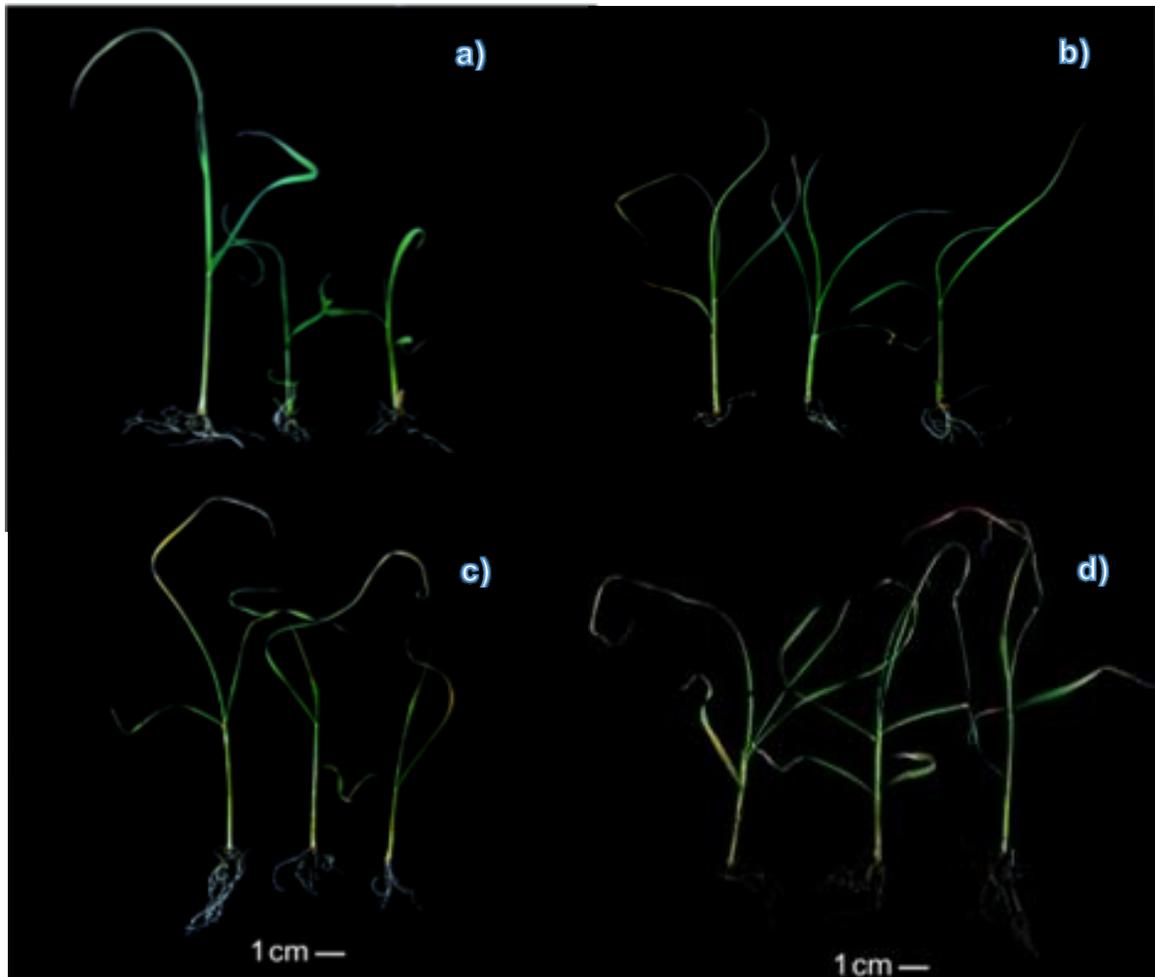


Figura 2 Fenotipificación de vitroplantas sometidas a estrés osmótico.

Se visualiza el fenotipo de plantas sometidas a estrés osmótico. En el panel a) se aprecian las vitroplantas que pertenecen al grupo testigo; panel b) vitroplantas sometidas a 24 horas en medio con agente estresante; c) vitroplantas a 48 horas imposición a estrés; d) vitroplantas a 72 horas de imposición a estrés, nótese zonas de hoja y raíz.

2.3.2 Cuantificación de prolina como parámetro bioquímicos en vitroplantas de *S. officinarum* L bajo condiciones de estrés osmótico

Como parámetro bioquímico se realizó la cuantificación de prolina, un aminoácido sintetizado por las plantas en respuesta al estrés para llevar a cabo el ajuste osmótico en las células.

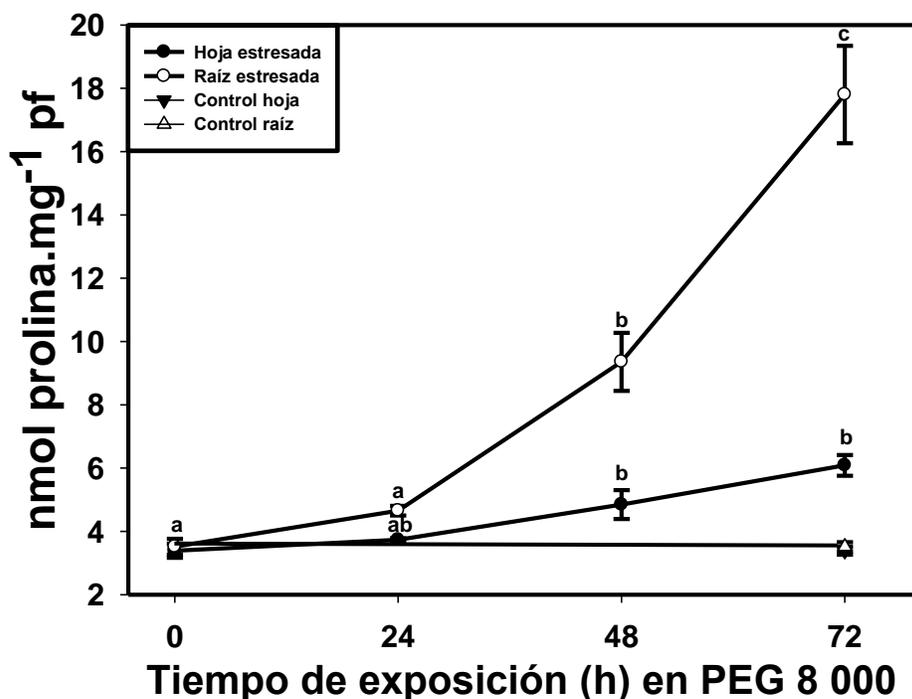


Figura 2.1 Cuantificación de prolina (Pro) en tejidos de caña de azúcar.

La concentración de prolina se determinó en hojas y raíces. De acuerdo con los resultados, se observó que la concentración de este aminoácido aumentó en ambos tejidos a las 48 y 72 horas pero en diferente magnitud. En el tejido de hoja, se observó un incremento del 44.4% ya que aumentó 3.5 nmol por mg⁻¹ de peso fresco hasta 6 nmol en 72 horas de exposición. Por otra parte, a pesar de que no hubieron diferencias significativas a las 0 y 24 horas, se halló un aumento del 47.48% y 79.05% a las 48 y 72 respectivamente en las raíces al compararse con el control. Cabe señalar que normalizamos y presentamos los datos con respecto al control.

2.3.3 Evaluación de parámetros fisiológicos de vitroplantas en *S. officinarum* L bajo condiciones de estrés osmótico

Con la finalidad de ahondar en algunos de los procesos fisiológicos en respuesta a estrés, se llevaron a cabo las siguientes mediciones de la tasa neta de la asimilación de fotosíntesis, tasa de transpiración, contenido relativo de agua y potencial osmótico, los cuales arrojaron los siguientes resultados ilustrados en la imagen.

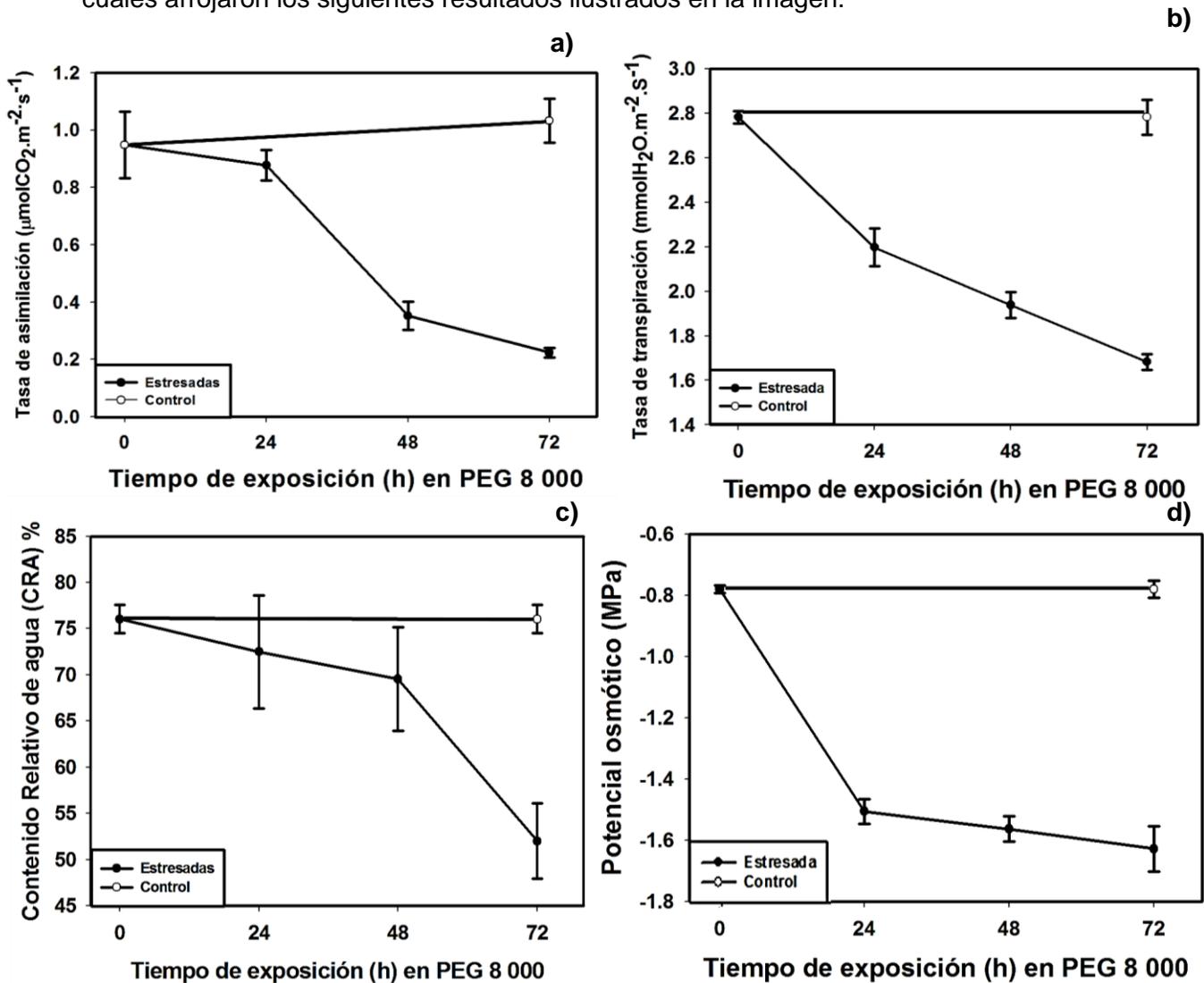


Figura 2.2 Mediciones fisiológicas. a) Eficiencia fotosintética; b) Tasa de Transpiración; c) Contenido relativo de agua y d) Potencial Osmótico

Los paneles indican el resultado de cada una de las mediciones a parámetros fisiológicos. De izquierda a derecha en la parte superior: a) la tasa neta de la asimilación de fotosíntesis; b) tasa de transpiración, c) contenido relativo de agua; d) potencial osmótico.

Integrando la información obtenida de las mediciones fisiológicas, se observa una correlación entre la respuesta fenotípica observada y la respuesta fisiológica y bioquímica de caña de azúcar. En el caso del contenido relativo de agua en hojas que el comportamiento del gráfico denota una pérdida gradual en el contenido intracelular de agua en el tejido; no obstante, no se presentaron diferencias estadísticas significativas a las 24 y 48 horas, respectivamente, al compararse con las 0 horas, también se apreció una pérdida en el contenido de agua de aproximadamente 31.5% a las 72 horas respecto al control, lo cual indica que a éste punto era notorio una pérdida de turgencia celular.

En el caso de la determinación del potencial osmótico, se visualizó un comportamiento que tendía a decrecer en función del tiempo de exposición ya que a las 48 y 72 horas decae un 50% respecto al control, lo cual se vincula al comportamiento del contenido relativo de agua, al menos a las 72 horas, y con la síntesis de osmolitos compatibles, como prolina, lo cual denota un aumento en su biosíntesis y acumulación en aras del ajuste osmótico, el cual es apreciado en la gráfica y descrito en su gráfica correspondiente.

En el caso de la eficiencia fotosintética, se observó que a 48 y 72 horas se presentan diferencias significativas dado que hay una reducción del 62.7% y 76% respectivamente lo cual apunta a un posible daño a la maquinaria fotosintética. Esto cobra sentido al correlacionarse con la tasa de transpiración la cual tiende a decrecer en función del tiempo de estrés, a las 48 y 72 horas se redujo en un 30% y 39% respectivamente al compararse con el control. Esto indica un posible cierre de estomas.

2.4 DISCUSIÓN

Se sabe que ante estrés hídrico, las reacciones de la planta difieren significativamente en varios niveles de organización (fisiológicos, bioquímicos, moleculares) en función de la duración del estrés así como del estadio fenológico de la planta y de su especie (Shao *et al.*, 2008). De manera puntual, la pérdida de la actividad metabólica ocurre en presencia de condiciones adversas, dado que durante el desarrollo del sistema radical se incrementa el consumo de agua y permite mantener la presión osmótica a través de la síntesis de osmolitos, como prolina (Shao *et al.*, 2008). Esto se relaciona con lo hallado en el experimento para cuantificar el contenido de prolina dado que en tejido de raíz se halló una mayor concentración de ésta molécula por estar en contacto directo con el agente estresante.

Como se había mencionado anteriormente, PEG se ha empleado como agente que induce estrés por déficit hídrico en varias especies de plantas, (Castro Montes 2008), siendo que en arroz, el uso de PEG más NaCl disminuye la toxicidad de la sal en las plántulas y por lo tanto reduce su tasa de muerte, ya que dicho agente estresante reduce el transporte de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ hacia el interior del tejido (Yeo y Flowers, 1984). En ésta misma especie, el estrés inducido por PEG causa la acumulación de prolina en el vástago y reduce la actividad de la enzima nitrato reductasa en las plantas (Pandey y Agarwal, 1998).

Hubiese sido bastante enriquecedor el realizar aún más pruebas bioquímicas para hallar las enzimas implicadas en el proceso de ajuste osmótico dado que Boaretto *et al.*, 2014, analizando bioquímicamente las respuestas del sistema antioxidante de un cultivar tolerante a sequía contrastándolo con una variedad comercial, halló que la actividad de la isoenzima superóxido dismutasa (SOD) (Cu/Zn-SOD-VI), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT) mostraron actividad implicada en la respuesta ante déficit hídrico.

Si bien es cierto que las expresiones de respuesta y susceptibilidad por parte de la planta no ocurren en el mismo orden, lo cual depende de la especie, variedad y/o estadio fenológico del organismo, una de las evidencias fisiológicas estriba en modificar el proceso fotosintético (Chaves *et al.*, 2009) dado que se da un proceso de fotoinhibición el cual incluye inactivación y daño irreversible al fotosistema II (PSII) (Li *et al.*, 2016).

Por otro lado, la degradación de clorofila en caña de azúcar expuesta a estrés osmótico puede incidir fatídicamente en la capacidad fotosintética, especialmente al nivel del complejo del PSII (Cha-Um y Kirdmanee, 2008), lo cual concuerda con lo antes mencionado dado que el comportamiento en el gráfico tiende a decrecer en función del tiempo de exposición, lo que lleva a suponer un daño categórico al complejo proteico de los fotosistemas. Otro aspecto a remarcar es el que concierne a la acumulación de prolina, la cual ha sido empleada como un indicador para la caracterización de genotipos tolerantes a estrés en caña de azúcar (Errabii *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2011); los osmolitos compatibles desempeñan un papel importante dado que protegen a las células contra los altos niveles de especies reactivas de oxígeno acumuladas en eventos de estrés, el aminoácido prolina se acumula en el citosol y vacuola durante el estrés (Hrishikesh Upadhyaya *et al.*, 2013), Otro aspecto a remarcar subyace en la capacidad que tiene para proteger la eficiencia del fotosistema II previniendo la peroxidación lipídica durante el estrés osmótico desencadenado por sequía (Molinari *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos, en lo que comprende a la cuantificación en hoja son equiparables con el comportamiento del gráfico reportado por Molinari *et al.*, 2007 dado que el comportamiento aumenta en función del tiempo de exposición al estrés, en este caso déficit hídrico; no obstante, en aquel trabajo reportan que el contenido de prolina las plantas transgénicas que sobre expresaron el gene que codifica para la enzima P5CS, no resultaron en un ajuste osmótico reportado en otras especies.

En el trabajo realizado por Cha Um y Kirdmanee, 2008, analizaron aspectos fisiológicos y bioquímicos ligados al estrés osmótico ocasionado por manitol, en dicha investigación hallaron que el contenido de prolina incrementó en función del aumento en la concentración del agente estresante, la cual alcanzó su máximo a los 300 mM de manitol siendo de manera inversa, aspectos fisiológicos tales como la eficiencia en el uso del agua, degradación de clorofila así como la síntesis y acumulación de sus tipos, a y b respectivamente así como el contenido total de carotenoides.

Abbas *et al.*, (2014) llegó a la conclusión de que los cambios inducidos por el estrés por sequía son reversibles a nivel celular en la caña de azúcar; dado que su concentración máxima de PEG fue de 12.5%, sus resultados discrepan de los nuestros debido a un aumento en la concentración de PEG. Otro aspecto diferente que notamos respecto a trabajos con vitroplantas fue el hallado por (Suriyan y Chalernpol, 2009) dado que

encontraron un aumento considerable de prolina en vitroplantas a nivel de hojas cuando al medio de cultivo se le suplementó con manitol y NaCl siendo que nosotros hallamos un aumento sustancial en raíz respecto a tejido de hoja.

2.5 CONCLUSIONES

Con base a las características particulares en las que se desarrollaron los experimentos y las subsecuentes mediciones, se concluye que existe una correlación entre los parámetros bioquímicos y fisiológicos medidos y la fenotipificación, lo cual conduce a que el estrés al que fueron sometidas las vitroplantas pudo causar los cambios necesarios para ser percibidos dado que existe una correlación mediada por el tiempo de exposición a estrés osmótico (PEG), en la cual se apreció un comportamiento directamente proporcional al tiempo, tal como se aprecia en el comportamiento en las mediciones de asimilación de CO₂, transpiración, contenido relativo de agua así como potencial osmótico, siendo este último inversamente proporcional con el contenido de prolina, lo cual se direcciona con el proceso de ajuste osmótico mediado por la síntesis de osmolitos compatibles.

De esta forma hallamos que en la fenotipificación se visualizaron los cambios a nivel de tejido a medida que avanzaba el tiempo de exposición, dado que pseudotallo, ápices foliares y radícula cambiaban de coloración, así como una pérdida de turgencia y vigor bastante evidente en las hojas así como en radícula.

CAPÍTULO III ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE VITROPLANTAS DE *Saccharum officinarum* L. EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO Y DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-qPCR

3.1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día, con los avances en cada disciplina ómica como lo es la transcriptómica, se ha logrado profundizar en el conocimiento y descubrimiento de genes asociados a cambios fenotípicos. La aplicación biotecnológica de ésta información permitirá incrementar el rendimiento de los cultivares mediante el mejoramiento en su tolerancia ante factores ambientales (Mochida y Shinozaki, 2010).

La tecnología RNA-seq, es usada como una poderosa herramienta que se fundamenta en la secuenciación de ADNc, la cual comprende inicialmente la captura del ARN total o ARNm, el cual es fragmentado por diversos métodos físicos y/o químicos para luego convertirse en una biblioteca de ADNc; siendo imprescindible el contar con ARN de buena calidad que represente todos los transcritos producidos en las condiciones deseadas, de tal forma que para el aislamiento del ARN suelen usarse kits de extracción de ARNm (Ward et al., 2012), en cuanto a cantidad y concentración del ARNm que se requiere para la tecnología RNA-seq, el rango está actualmente entre 5 y 10 µg, con una concentración alrededor de 500 ng/µl.

Como se había mencionado anteriormente, la fragmentación puede realizarse por métodos físicos y/o químicos, como por nebulización, digestión por enzimas de restricción o, en su defecto, usando cationes divalentes bajo condiciones de presiones elevadas (Wang et al., 2009); obtenido el ADNc se ligan adaptadores de forma que cada fragmento generado poseerá un adaptador ligado a sus extremos 3' y 5', los cuales se pueden ligar directamente a la muestra de ARN, previa síntesis de ADNc (Core et al., 2008; Marguerat y Bähler, 2010), o adicionando directamente a la cadena sencilla de ADNc (Maher et al., 2009; Marguerat y Bähler, 2010).

Por otro lado, dentro de las aplicaciones y ventajas que tiene la tecnología RNA-seq está que da una cobertura completa de transcritos, genera información tanto de la secuencia como de la estructura de exones y sitios de *splicing* alternativo (Lister et al., 2009; Gullledge et al., 2012). Asimismo, los datos arrojados por RNA-seq tienen una alta precisión con respecto a los niveles de expresión génica que se obtienen a través de PCR (*polimerase*

chain reaction) cuantitativa (qPCR) (Nagalakshmi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2012), habiéndose mostrado que los resultados son altamente reproducibles (Wang *et al.*, 2009). Actualmente la tecnología RNA-seq es promovida por las compañías Roche/454, Solexa/ Illumina, SOLiD/Life Technologies y Helicos/ BioSciences; siendo las tecnologías de NGS más aplicadas Roche/454 y Solexa/ Illumina (Strickler *et al.*, 2012). No obstante, estas compañías y otras no cesan en la búsqueda de mayores rendimientos de secuenciación, obtención de lecturas más largas que se lleven a cabo en tiempo real y cada vez a costos más bajos (Metzker, 2010; Mardis, 2011).

La tecnología RNA-seq, permite analizar especies prescindiendo de un genoma de referencia, lo cual provee de datos transcripcionales para un entendimiento profundo acerca de los procesos moleculares que gobiernan las respuestas de las plantas en determinada condición de estrés (Metzker 2010; Imadi *et al.*, 2015), de tal forma que a la fecha, existen trabajos a nivel transcriptómico en caña de azúcar los cuales se enfocan en la acumulación de sacarosa en estadios de desarrollo en hojas y tallo (Cardoso-Silva *et al.*, 2014; Mattiello *et al.*, 2015)

3.1.2 Validación por RT-qPCR

Actualmente, con la implementación de nuevas tecnologías de secuenciación, se hace patente la necesidad de confirmar los resultados obtenidos, esto es, darle un soporte a través de técnicas finas que sirvan para validar la expresión génica en tiempos y/o condiciones determinados, dándole hasta un valor estadístico. Con la implementación de técnicas tales como qPCR se pueden validar datos de expresión génica obtenidas por otros métodos, ya que ésta técnica es considerada como la más precisa y confiable (Rapacz, 2013), siendo que en condiciones de estrés, al usar actina (ACT) como endógeno se apreció una expresión estable, razón por la cual ha sido considerado como un buen gen de referencia en respuesta a estrés abiótico, en este caso sequía (Rapacz, 2012).

Los resultados de procesos de secuenciación masiva pueden ser afectados por la cantidad de muestra usada para la extracción de ARN, la integridad de éste, así como el diseño de cebadores, la calidad del cDNA y la eficiencia de la reacción (Bustín *et al.*, 2009; Zhuang H *et al.*, 2015 y Andersen *et al.*, 2004). Aunado a lo antes mencionado, es de considerarse que existen diferentes niveles de expresión génica que varían en función del tejido, especie

y/o condiciones experimentales (Schmittgen *et al.*, 2000; Ruan-Lai, 2007 y Czechowski *et al.*, 2005) para reducir estas inconsistencias y asegurar la exactitud y fiabilidad de los resultados es necesario usar controles internos específicos para efectos de determinación de los niveles de expresión génica.

Se usan como controles los siguientes genes dados su papel en procesos meramente elementales a nivel celular, siendo éstos: GAPDH (gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa), factor de elongación-1 α (EF-1 α), tubulina β (β -TUB), poliubiquitina (UBQ), 18S RNA ribosomal (18S rRNA), y actina (ACT) (Zhuang H *et al.*, 2015; Zaho 2016); por otra parte, en estudios de expresión génica en zanahoria, los genes como actina y tubulina β son los que presentaron mayor estabilidad identificados entre todo el grupo de muestras de hoja en zanahoria expuesta a tratamientos de estrés abiótico y estímulos hormonales (Tian *et al.*, 2015).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Inducción del estrés osmótico en plántulas de *S. officinarum* L.

Se partió de plántulas de caña de azúcar, de la variedad *cv mex 69290* de tres meses de edad, con aproximadamente 10 cm de altura las cuales fueron dispuestas en cajas magenta con 50 ml de medio MS (MS) suplementado con Polietilenglicol al 40%.

El bioensayo consistió en exponer a diferentes tiempos a las plántulas (24, 48 y 72 horas respectivamente), posteriormente, como se menciona en el apartado de materiales y métodos (ver sección 2.2) se procedió a extraer ARN total de hojas y raíces por duplicado, esto con la finalidad de contar con 16 bibliotecas, las cuales generaron unos 252,702 transcritos totales con sus respectivas isoformas y 140, 339 unigenes.

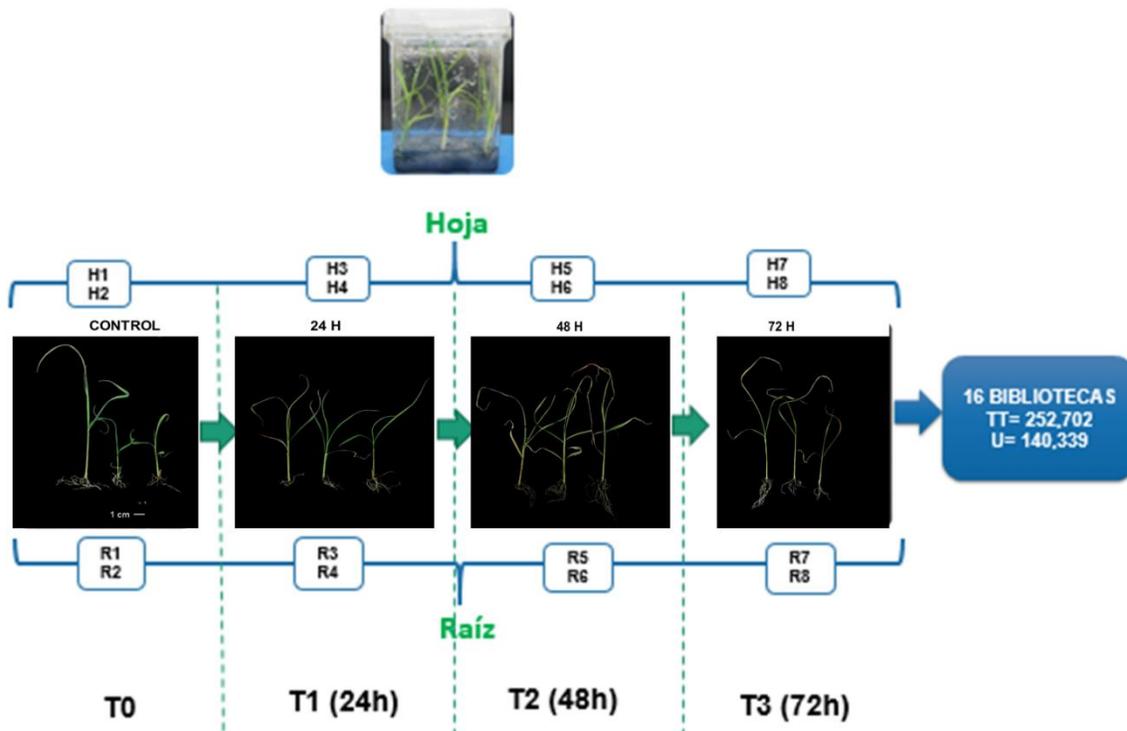


Figura 3. Representación esquemática del diagrama de inducción del estrés osmótico hasta la obtención de bibliotecas con sus respectivos transcritos.

3.2.2 Extracción de ARN total de tejidos de hoja y raíz

Para la extracción de ARN total, se maceraron en promedio 150 mg de tejido tanto de hoja como de raíz en N₂ líquido. El pulverizado se homogenizó con 1.2 ml de TRIzol y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante mezclándose con 0.24 mL de cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 50:1, centrifugándose a 12000 g por 15 minutos a 4° C.

El ARN fue precipitado con 1 volumen de isopropanol y 1µL de glicógeno a **-20°C**. La muestra se centrifugó otra vez a 12000 g por 10 minutos a 4°C. El pellet de ARN con etanol-DEPC al 70% y se resuspendió en H₂O DEPC estéril. Se determinó la concentración de las muestras mediante Nanodrop® y finalmente se analizó la calidad e integridad de las muestras mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio 1µg/mL. Su posterior calidad usando el dispositivo Bioanalyzer (Agilent Technologies®) siendo que se agruparon cantidades iguales de ARN de alta calidad de cada muestra para la preparación de cada biblioteca

3.2.3 Flujo de análisis bioinformático

Después de recibir y descargar de los servidores de la empresa que realizó el proceso de secuenciación (Servicios Genómicos LANGEBIO), se llevó a cabo el filtrado de las mismas para retener calidades, posteriormente se realiza el ensamble *de novo* en la plataforma Trinity^R, acto seguido, se realiza la estimación de la abundancia de los transcritos y sus respectivas isoformas. Aunado a lo antes descrito se lleva a cabo un análisis de la expresión diferencial de los transcritos a través de la plataforma Bioconductor^R para, finalmente, llevar a cabo la anotación de los genes en blast2go^R (b2g).

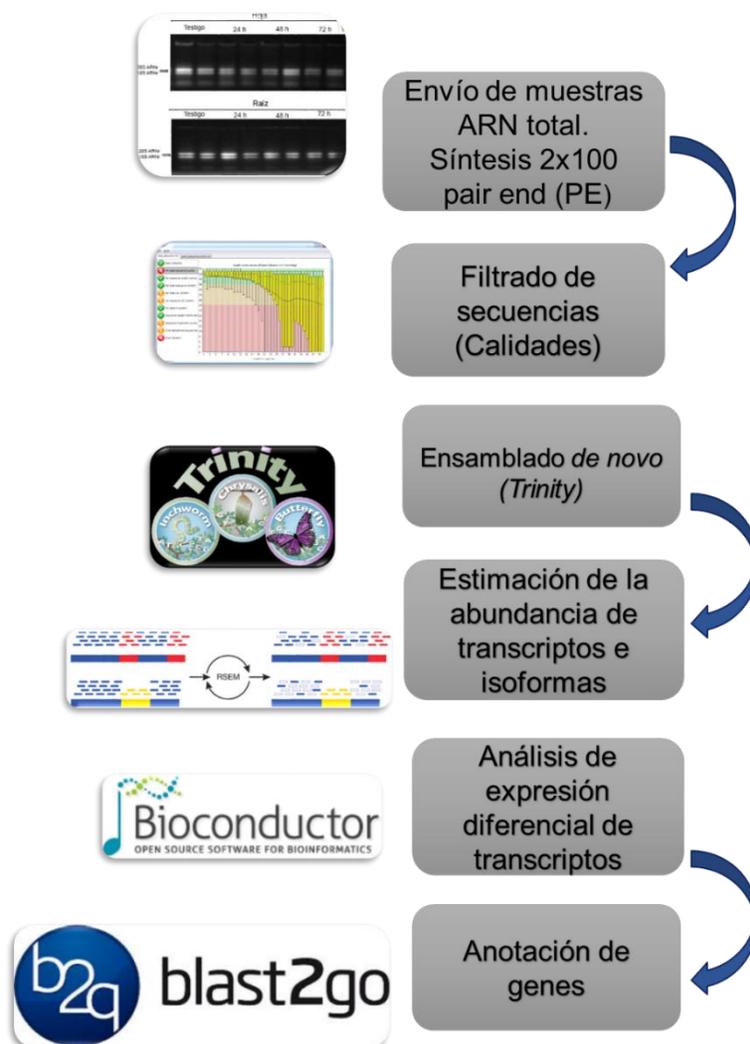


Figura 3.1 Representación esquemática del diagrama de flujo bioinformático para la obtención del transcriptoma de *S. officinarum* L.

3.2.4 Construcción de las bibliotecas

Las bibliotecas fueron construidas en la Unidad de Genómica Avanzada del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional (LANGEBIO-CINVESTAV) en la Unidad de Irapuato, Guanajuato, las cuales fueron preparadas usando la plataforma TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina), siendo que para la secuenciación tipo high-throughput Sequencing (secuenciación de alto rendimiento), las secuencias de extremos pareado se obtuvieron a partir de 16 bibliotecas con un rendimiento de ~410 millones de lecturas limpias con ~22 de lecturas por biblioteca; las bibliotecas fueron secuenciadas en una configuración 2x100 pb de la plataforma HiSeq2500 Illumina. Las bibliotecas tenían un tamaño de fragmento de 335 pb. Cabe mencionar que el análisis de calidad de las lecturas crudas se llevó a cabo con la herramienta FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), con la finalidad de suprimir los adaptadores, limpiar y filtrar la calidad de las lecturas obteniendo valores por iguales o mayores a 30 nucleótidos y tamaños de cada lectura por encima de 80 nucleótidos usando la herramienta Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014).

Para el ensamble *de novo* se usó el software Trinity en su versión v2.2.0, (Grabherr *et al.*, 2011) el total de los unigenes, su distribución así como su longitud, el estadístico N50 así como la cobertura promedio, fueron los parámetros evaluados para obtener la calidad en el ensamble; posterior al ensamble, los unigenes fueron anotados en función de su ontología génica (GO), códec de enzimas (EC) usando el software Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005).

La anotación como tal se fundamentó en la homología con proteínas de otras especies de plantas usando BLASTX, además de complementarse con la información de INTERPROSCAN (Zdobnov y Apweiler, 2001) así como la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) de vías bioquímicas ampliado con el uso de ANNEX (Myhre *et al.*, 2006).

Con la finalidad de robustecer el trabajo, se realizó un BLAST cotejando contra la base de datos de Swiss-Prot (www.uniprot.org) así como TrEMBL; se usó el software TransDecoder v3.0.0 para la identificación de regiones codificantes dentro de las secuencias de los unigenes generados en el ensamble, para posteriormente realizar una búsqueda por homologías contra la base de datos de Pfam-A v9.0 (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/releases/>) así como una búsqueda contra la base de datos de dominios conservados Conserved Domain Database (CDD; Marchler-Bauer *et al.*, 2015) usando la herramienta Batch CD-Search tool (Marchler-Bauer y Bryant, 2004).

3.2.5 Análisis de la expresión diferencial y anotación por GO (Gene Ontology)

Las abundancias de expresión fueron determinadas por el mapeo de las bibliotecas (cada replica por cada tejido) contra el transcriptoma generado usando el software RSEM v1.2.27 (RNA-Seq by Expectation-Maximization; Li y Dewey, 2011) echando mano del alineador bowtie (Langmead, 2010). Es necesario mencionar que la expresión fue normalizada a transcripciones por millón de transcritos (TPM) representando así el nivel de expresión génica. Por otra parte, la expresión diferencial de genes (DEGs) entre cada tratamiento y tejido fue determinado usando la herramienta EdgeR (Robinson *et al.*, 2009) la anotación funcional se llevó a cabo usando el software Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005).

3.2.6 Análisis de datos

El análisis de datos y gráficos en el flujo de análisis bioinformático fueron realizados con el uso del paquete estadístico R (R Development Core Team, 2009).

3.2.7 Extracción de ARN, validación por RT-qPCR

3.2.7.1 Repetición de tratamiento, extracción, tratamiento de RNA y síntesis de cDNA

Para la extracción de ARN de vitroplantas de caña de azúcar, el material biológico se escindió en parte aérea y raíz. La extracción de ARN fue llevada a cabo por el método de TRIZOL® RNA Reagent (Invitrogen®), sometido a tratamiento con DNasa (DNase I, Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el ensayo de RT-qPCR, se realizó la síntesis de cDNA usando 500 ng de ARN total usando M-MLV Transcriptasa (Promega) acorde a las instrucciones del fabricante. Para efectos de del análisis de RT-qPCR se utilizó el equipo PikoReal24 (real-time PCR system, Thermo Fisher Scientific, Ratatsie 2, FI-01620 Vantaa, Finland).

3.2.7.2 Condiciones de RT-PCR

Para el análisis de expresión, se usó como fluoróforo SYBR Green (DyNAmo ColorFlash qPCR Kit Thermo Scientific), usándose 25 ng de cDNA como template llevándose la reacción a un volumen final de 13 μ L. El protocolo de PCR usado fue el siguiente: 1) Desnaturalización a 95 °C por 7 min, 2) ciclado de dos etapas a 95°C durante 30 s y la Tm

para cada primer específico durante 30 s por 45 ciclos, 3) Temperatura final de fusión en el intervalo desde 55°C a 95°C. Cada reacción fue realizada por duplicados biológicos y triplicados técnicos tomando como controles alícuotas de agua para cada primer. Se utilizó el método de dos pasos para la amplificación por RT-qPCR calculándose la expresión relativa por el método $2^{\Delta\Delta CT}$. Se usó actina como control interno.

3.2.7.3 Primers usados

Para efectos de la validación del transcriptoma, se seleccionaron 5 unigenes al azar (*SWT6a*, *NAC025*, *STK*, *ABIP3* y *PIP2*) los cuales fueron probados por RT-qPCR. (Véase tabla III.IV).

Cuadro 3 Características de primers usados para validar el transcriptoma

Gene	Primer name	Primer sequence	Tm	Tamaño de amplicón
<i>NAC transcription factor 25-like</i> (NAC)	qNAC25-Fw	5'-CAGCAGAGCCCACTCAAGA-3'	60°C	<u>151 bp</u>
	qNAC25-Rev	5'-CAAACACGGAGAAGGCGTTG-3'		
<i>Serine threonine-kinase</i> (Stk)	qSTK-Fw	5'-CTCAGCCAGAATCCCAAAGGAC-3'	60°C	<u>94 bp</u>
	qSTK-Rev	5'-GGAGTATGTCTTGGCATTCCAGG-3'		
<i>Bidirectional sugar transporter SWEET6a-like</i> (Sweet6a)	qSWT6a-Fw	5'-CATCTTCTTCATCTACTCCGAC-3'	60°C	<u>77 bp</u>
	qSWT6a-Rev	5'-CCACGAACAGAATCTCCAC-3'		
<i>abscisic acid 8-hydroxylase 3-like</i> (ABIP3)	qABIP3-FW	5'-ATACCATGAAGACGCTCACCTTC-3'	64°C	<u>111 bp</u>
	qABIP3-REV	5'-CTTTCTCCACGATCAAGTAGT-3'		
<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> (Pip2)	qPIP2-FW	5'-GTGTTTCATGGTGACCTGG-3'	65°C	<u>177 bp</u>
	qPIP2-Rev	5'-GAGGATGTACTGGTGGTAGAAGG-3'		

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción de RNA total de tejidos de hoja y raíz

Con base a lo descrito en la sección II.3.7 se preparó un gel de agarosa al 1% para discernir la calidad del ARN antes de su envío para la secuenciación, en la cual se aprecian patrones definidos de bandeo tanto para hoja como para raíz, además de apreciarse las bandas concernientes a las subunidades 28 y 18 S.

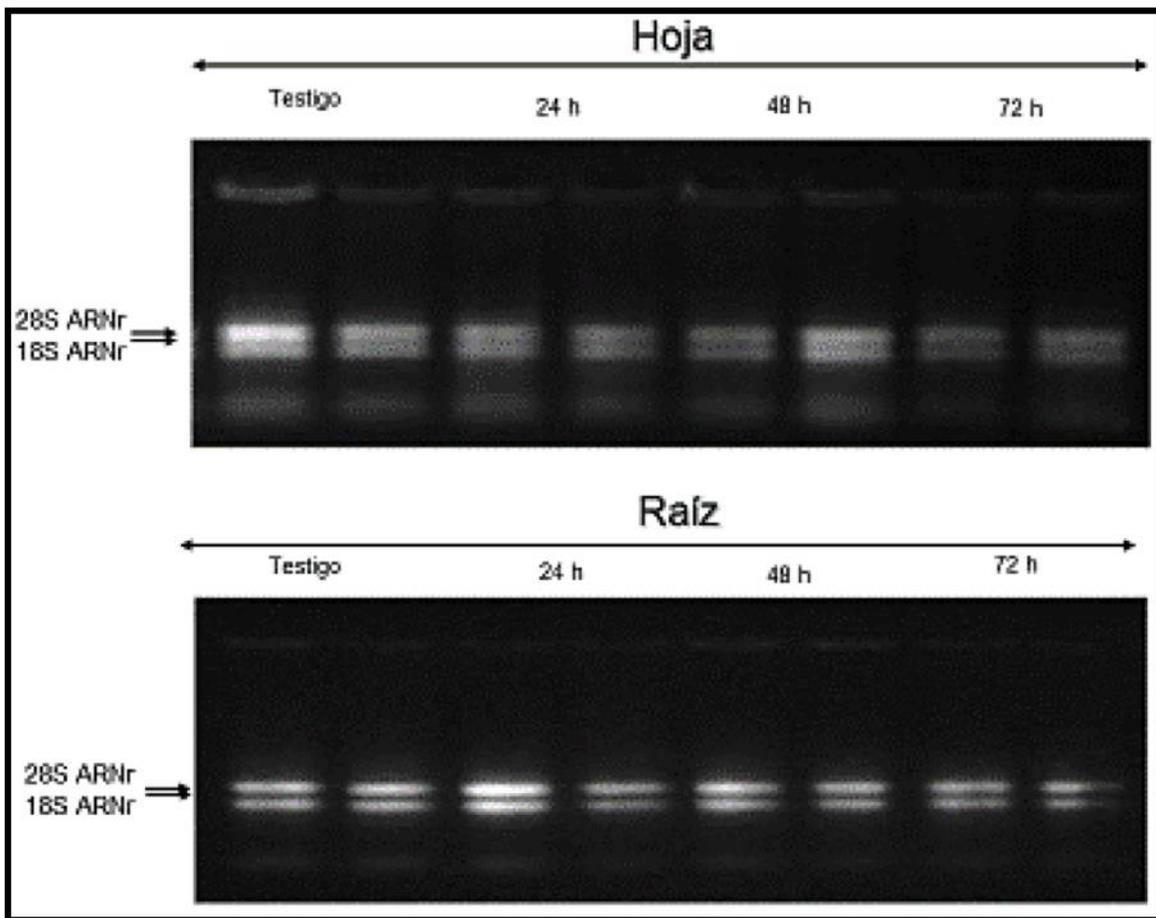
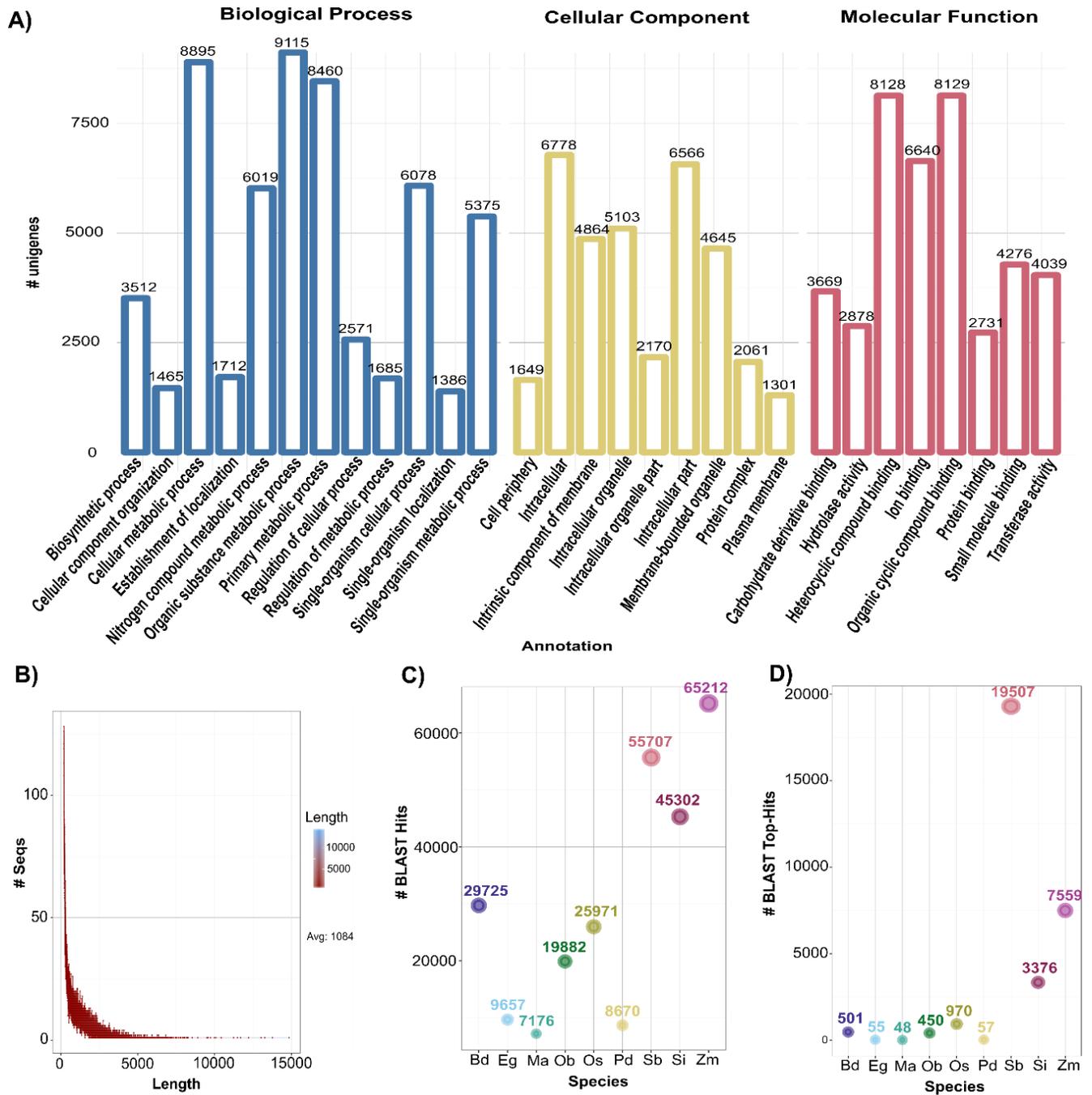


Figura 3.2 Electroforesis en gel de agarosa al 1% corroborando integridad de muestras de ARN total para secuenciación.

3.3.2 Ontogenia y anotación de unigenes



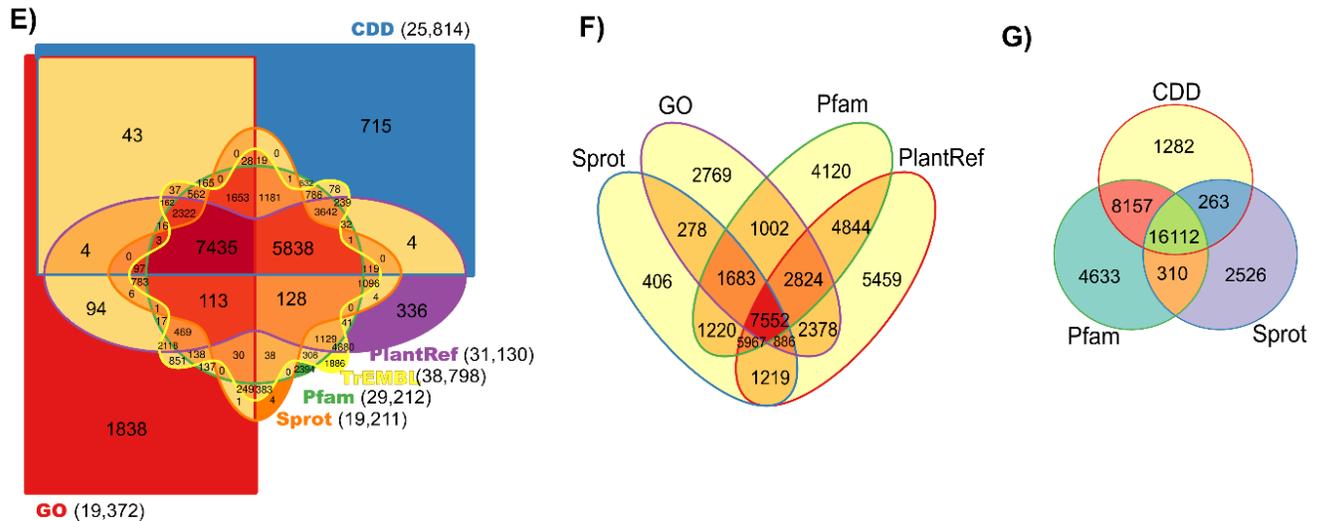


Figura 3.3 Ontogenia y anotación del total de unigenes expresados en respuesta a estrés osmótico.

La clasificación por Gene Ontology (GO) de los unigenes anotados en GO en Blast2GO se dividió en las 3 principales categorías: Biological Process (Procesos biológicos), Cellular Component (Componentes celulares) así como Molecular Function (Función molecular). B) Distribución de las longitudes de los unigenes ensamblados. C) Distribución de los mejores hits de BLASTX de los unigenes anotados tomando las 10 especies de mayor relevancia encontradas en la base de datos de proteínas PlantRef. D) Distribución de los resultados de los hits de TopBLASTX para los unigenes mapeados tomando las 10 especies de mayor relevancia encontradas en la base de datos de proteínas PlantRef. E) Diagrama de Venn mostrando los resultados del BLAST de las unigenes únicos y compartidos entre las bases de datos CDD, GO, Pfam, Sprot, TrEMBL y PlantRef. F) Diagrama de Venn mostrando los unigenes compartidos entre las bases de datos de GO, Pfam, Sprot y PlantRef. G) Diagrama de Venn mostrando los resultados del BLAST de las tres principales bases de datos de proteínas las cuales son Pfam, Sprot y CDD. La nomenclatura usada para nombrar las especies mencionadas en los paneles C) y D) fueron Bd=Brachypodium distachyon, Eg=Elaeis guineensis, Ma=Musa acuminata subsp. Malaccensis, Ob=Oryza brachyantha, Os=Oryza sativa Japonica, Pd=Phoenix dactylifera, Sb=Sorghum bicolor, Si=Setaria italica, así como Zm=Zea mays. Los gráficos fueron realizados con los paquetes en R de ggplot2 y Venerable.

Los unigenes obtenidos fueron mapeados contra la base de datos GO, siendo que un total de 19,372 unigenes fueron catalogados en función de 29 subcategorías de las 3 principales categorías: procesos biológicos (Biological Process), funciones moleculares (Molecular Functions) y componentes celulares (Cellular Component). En lo que atañe a la categoría de procesos biológicos, las subcategorías más representativas fueron “Organic substance

metabolic process” (procesos metabólicos de sustancias orgánicas), “Cellular metabolic process” (procesos metabólicos celulares) así como los comprendidos en “Primary metabolic process” (procesos metabólicos primarios); en la clasificación de componentes celulares (Cellular Component) las subcategorías con mayor contenido de unigenes fueron “Intracellular” (Intracelular) así como “Membrane-bounded organelle” (organelo delimitado por membrana). Para el caso de funciones moleculares (Molecular Function) las principales subcategorías fueron “Organic cycling compound binding” (unión de compuestos orgánicos cíclicos) así como “Heterocyclic compound binding” (compuestos de unión heterocíclicos).

La longitud de los unigenes se situó entre las 201-14,847 bases con un promedio de 1,084 bases y una longitud del valor N50 de 1,213 bases. Entre los unigenes anotados, se halló una fuerte homología con *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, y *Setaria itálica*, las cuales están emparentadas con *S. officinarum* L. Para dilucidar las características y funciones de los unigenes, éstos se anotaron mapeándolos contra bases de datos públicas para luego esquematizarlos por medio de diagramas de Venn, con lo cual se realizaron diversas topologías de dichos diagramas para robustecer la comparación.

3.3.3 Análisis global de los DEGs (genes expresados diferencialmente) en condiciones de estrés osmótico

Para identificar los DGEs involucrados en respuesta a estrés osmótico, se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de expresión usando el software RSEM software v1.2.27 (Li and Dewey, 2011) para cada muestra siendo que el total de las lecturas se normalizó a valores RPKM (Reads Per Kilobase Million). Para efectos de contar con valores confiables en esta sección del análisis entre las réplicas biológicas, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson de la expresión génica usando la paquetería R (R development core), siendo que el coeficiente de correlación entre cada repetición se situó por arriba de 0.95 lo que denota una repetibilidad satisfactoria. Un aspecto clave es el que estriba en comparar directamente los cambios de los patrones de expresión entre todas las muestras, usando un valor de cambio (Fold Change) >2 y un valor de P ajustado (FDR) a <0.001 dado que los DGEs comprendidos entre los tratamientos T1, T2 y T3 se compararon con los transcritos de hoja y raíz del T0. Ahora bien, para dilucidar la expresión diferencial tejido-específico en función del tiempo de exposición a estrés, se realizó un mapa de calor de 12,662 DGEs.

Se aprecian perfiles de expresión bastante similares para las muestras T0 (hoja y raíz no estresadas) indicándose grupos específicos de muestras con exposición a estrés (T1, T2 y T3) en función del tejido. Con fines de identificar los patrones de expresión temporal de los genes, 5a en el mapa de calor se dividió en 6 grupos de expresión (log₂) mostrando patrones de expresión muy similares. b-g cada perfil denota un grupo de DEGs que muestran una tendencia de expresión similar.

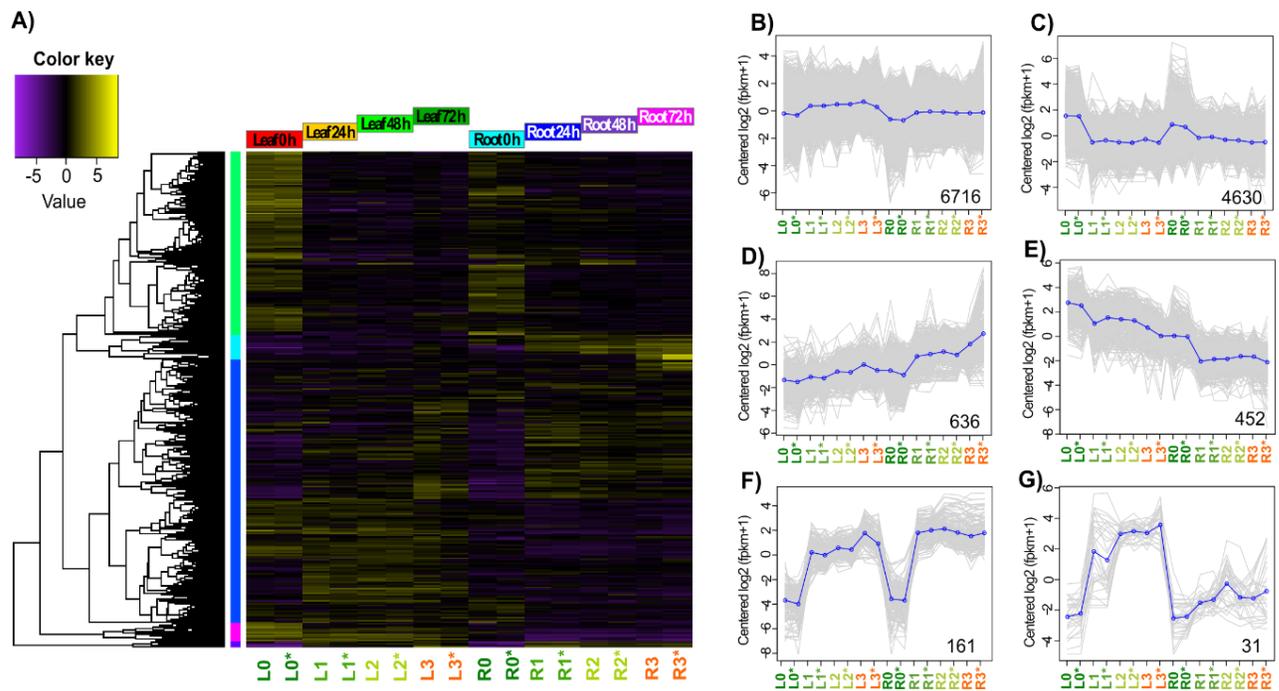


Figura 3.4 Correlación y agrupación de los DEGs sometidos a estrés osmótico

Mapa de calor (Heatmap) de la expresión y agrupación de genes con patrones de expresión similares. A) Conjunto de 12,662 DEGs con expresión tejido-específico ($FDR \leq 0.001$ y $FC \geq 2$) expresados en el mapa de calor para los respectivos tratamientos. B-G) En cada panel de la figura se denota el comportamiento de los grupos de DEGs, siendo que los grupos fueron organizados en función de su patrón de expresión durante la exposición al estrés osmótico. Líneas grises denotan el comportamiento de cada grupo de genes así como el perfil medio de expresión para cada grupo el cual es representado en líneas azules. El número inferior indica la cifra de genes. L=leaf (hoja), R= root (raíz); L0 y R0= Testigos; L1 y R1= 24 horas de exposición a estrés; L2 y R2= 48 horas de exposición a estrés; L3 y R3=72 horas de exposición a estrés. *=replica biológica.

3.3.4 Grupos de transcritos compartidos entre tratamientos de estrés (hoja y raíz)

En hoja, a las 24 horas de exposición al estrés, se hallaron un total de 3,539 DEGs, los cuales incluyen un total de 1,220 genes expresados a la alza y 2,139 genes con actividad transcripcional a la baja; para el tratamiento de 48 horas bajo estrés, 5,033 genes fueron diferencialmente expresados incluidos 1,753 que tuvieron actividad transcripcional a la alza así como 3,280 que presentaron una actividad a la baja; para las 72 horas de exposición a estrés, un total de 3,224 transcritos fueron hallados con una expresión diferencial, de los cuales 1,382 fueron regulados a la alza en contraste con 1,824 que presentaron actividad transcripcional a la baja.

En el caso de los genes expresados a la alza en tejidos de hoja, 887 genes fueron compartidos entre las 24 y 48 horas de tratamiento, 802 genes que se compartieron entre las 48 y 72 horas y 671 que se hallaron entre las 24 y 72 horas de exposición a estrés, respectivamente, de manera interesante, 536 genes se compartieron a lo largo de los tratamientos (7a) los cuales se nombraron, para efectos de la realización de este proyecto, como CORE of Up-regulated Leaf Genes (CULG).

De manera contrastante, para los DEGs con actividad transcripcional a la baja en hoja, 1,765 genes fueron compartidos entre las 24 y 48 horas de exposición a estrés, respectivamente; por otra parte, 1,393 genes se compartieron entre las 48 y 72 horas siendo que 1,223 genes se compartieron entre las 24 y 72 horas. Interesantemente, 1,093 genes se compartieron entre todos los tratamientos (7d), los cuales se denominaron CORE de Down-regulated Leaf Genes (CDLG).

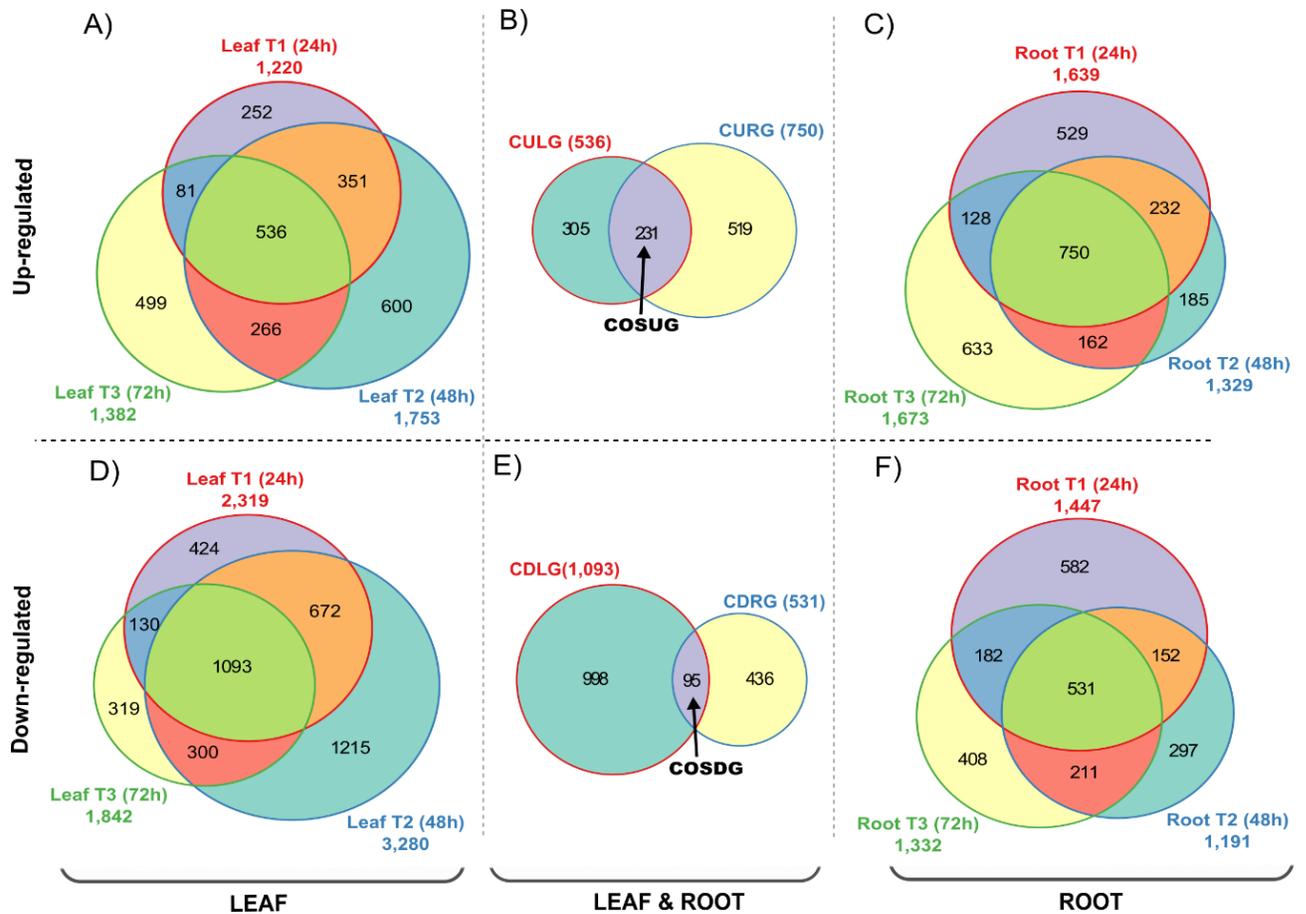


Figura 3.5 Análisis comparativo de los DEGs únicos y compartidos entre los tratamientos de estrés osmótico en vitroplantas de caña de azúcar cv MEX-69290

Los diagramas de Venn denotan la superposición de los DEGs de hoja y raíz en respuesta a estrés osmótico. Panel A-C) Comparación entre los DEGs a la alza provenientes de tejidos de hoja y raíz en los diferentes tiempos de exposición a estrés. Panel D-F) Comparación entre los DEGs con actividad transcripcional a la baja proveniente de hoja y raíz en los diferentes tiempos de exposición a estrés. Sección B y E) Comparación entre los genes CORE siendo que se uniformizó la nomenclatura para nombrar los set de CORE. CULG= CORE de Up-regulated Leaf Genes; CURG=CORE de Up-regulated Root genes; COSUG=CORE de Osmotic Stress Up-regulated Genes; CDLG=CORE de Down-regulated Leaf Genes; CDRG=CORE de Down-regulated Root Genes así como el COSDG=CORE de Osmotic Stress Down-regulated Genes. Los diagramas de Venn fueron realizados usando la paquetería Vennereable en R.

Para efectos de la evaluación de DEGs en raíz, a las 24 horas se hallaron 3,086 DEGs que incluyeron 1,639 genes con actividad transcripcional a la alza en contraste con los 1,447 a la baja; de manera interesante vemos como para las 48 horas se encontraron 2,520 DEGs de los cuales 1,329 fueron a la alza y 1,191 a la baja, mostrándose poca disparidad entre ambos tipos de DEGs. La cantidad de DEGs que se expresaron durante las 72 horas fue de 3,005, de los cuales 1,673 fueron expresados a la alza en contraste con los 1,332 que mostraron actividad a la baja.

Para el caso de los DEGs con expresión a la alza, se encontró que 982 genes se compartieron entre las 24 y 48 horas, 912 entre las 48 y 72 horas así como 878 que se compartieron entre las 24 y 72 horas. Adicionalmente, 750 genes se compartieron entre todos los tiempos de exposición al estrés, razón por la cual se nombraron como “CORE de Up-regulated Root genes” (CURG). Para efectos del análisis de los DEGs con actividad transcripcional a la baja, se halló que 683 genes estaban interconectados entre las 24 y 48 horas de exposición a estrés, respectivamente; 713 DEGs compartidos entre las 24 y 72 horas respectivamente, siendo que se hallaron 531 DEGs intrínsecamente ligados entre todos los tratamientos, a los cuales se nombraron como “CORE de Down-regulated Root Genes” (CDRG).

Adicionalmente, se hallaron 231 DEGs compartidos entre el set CORE de los reguladas a la alza tanto en hoja como en raíz, los cuales se agruparon en el COSUG (CORE de Osmotic Stress Up-regulated Genes) (Fig. 7B), por otra parte, 95 DEGs se compartieron del set de CORE de los que tenían actividad transcripcional a la baja tanto para tejidos de hoja y raíz, a los cuales se les nombró como COSDG (CORE de Osmotic Stress Down-regulated Genes).

De manera interesante, había 1,956 unigenes ensamblados correspondientes a FT, de los cuales 148 estuvieron regulados mostrando su aparición a las 24 horas, siendo que 174 FT fueron regulados a las 48 horas y 127 a las 72 horas de exposición, respectivamente, a estrés; contrastando con lo hallado en raíz en donde 80 FT fueron regulados a las 24 horas, 70 a las 48 y 48 a las 72 horas de exposición a estrés, respectivamente. Para los FT a la alza, en tejidos de hoja, 15 de ellos se compartieron entre todos los tratamientos (CULG) y

62 con actividad transcripcional a la baja se compartieron entre todos los tratamientos (CDLG).

Al compararse con tejidos de raíz, 19 FT con actividad transcripcional a la alza se compartieron entre todos los tratamientos (CURG) siendo que solo 15 FT mostraron actividad a la baja (CDRG). Un aspecto interesante es el hecho de que solo 2 FT se compartieron entre los DEGs a la alza par ambos tejidos (COSUG) los cuales fueron NAC25-like (DN49045_c1_g1_i1) así como HSF-C2a (DN55043_c4_g1_i6) de tal manera que también solo 2 FT con actividad a la baja, se compartieron para ambos tejidos (COSDG), los cuales fueron ERF27-like (DN45748_c0_g1_i3) así como un DREB1G-like (DN50424_c7_g1_i1).

3.4 Validación del transcriptoma por RT-qPCR

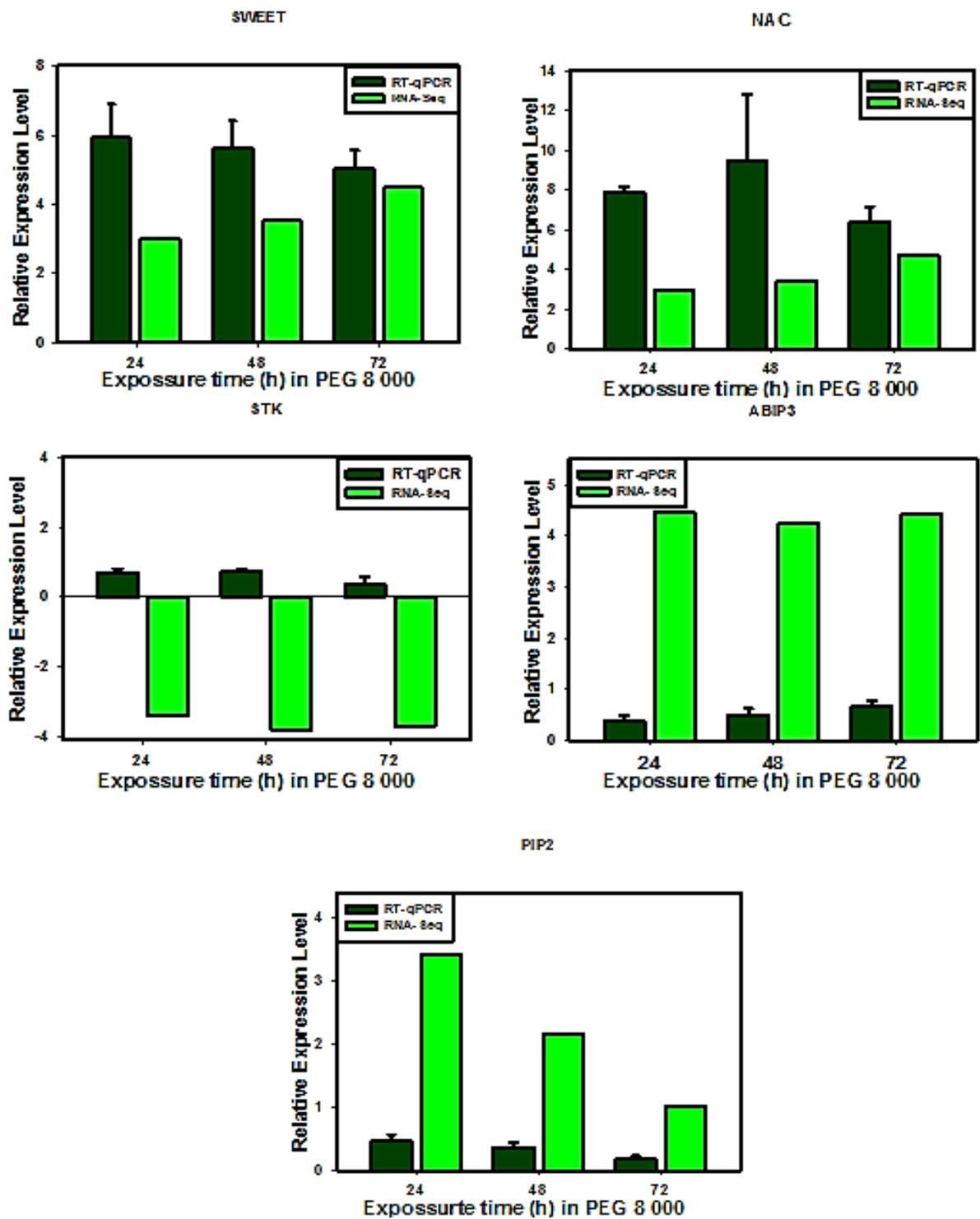


Figura 3.6 Cuantificación de la expresión relativa en hoja.

Para este apartado de la investigación, se seleccionaron genes para realizar su cuantificación de la expresión génica al contrastarse con los datos arrojados por el análisis transcriptómico para apreciar si existe algún sesgo, discrepancia y/o similitud en cuanto a la tendencia en lo que respecta a la expresión génica.

Para el caso de Sweet, se aprecia que por medio de RT-qPCR existe una tendencia decreciente en función del tiempo de exposición a estrés, la cual oscila de casi 6 a 4.5 veces; no obstante, se aprecia una tendencia inversamente proporcional por parte de los datos obtenidos a partir del transcriptoma. En la cuantificación de la expresión génica para el caso de NAC, se aprecia que la tendencia contrasta con lo reportado en el transcriptoma, dado que tiende a incrementarse al curso de las 48 horas para luego descender a las 72 horas, al compararse con los resultados obtenidos en el transcriptoma se aprecia que éstos tienden a incrementar a mitad que transcurre la imposición al estrés.

Interesantemente se aprecia un comportamiento llamativo, dado que los resultados obtenidos por RT-qPCR tienden a disminuir en función del tiempo de exposición a estrés; sin embargo, los datos del transcriptoma fueron inversamente proporcionales presumiblemente por la escala con la que se realizó la gráfica. Los niveles de expresión relativa para ABIP3 fueron contrastantes dado que por RT-qPCR los niveles de expresión tuvieron un ínfimo aumento el cual se vio ofuscado por la tendencia de los niveles de expresión obtenidos en el transcriptoma ya que presentaron niveles altos, en promedio 4 veces con respecto a 0.8 veces por el RT-qPCR.

Al cuantificarse los niveles de expresión génica en PIP2 se apreció un comportamiento similar, a pesar de que por RNA-seq los niveles fueron mucho mayores que por RT-qPCR.

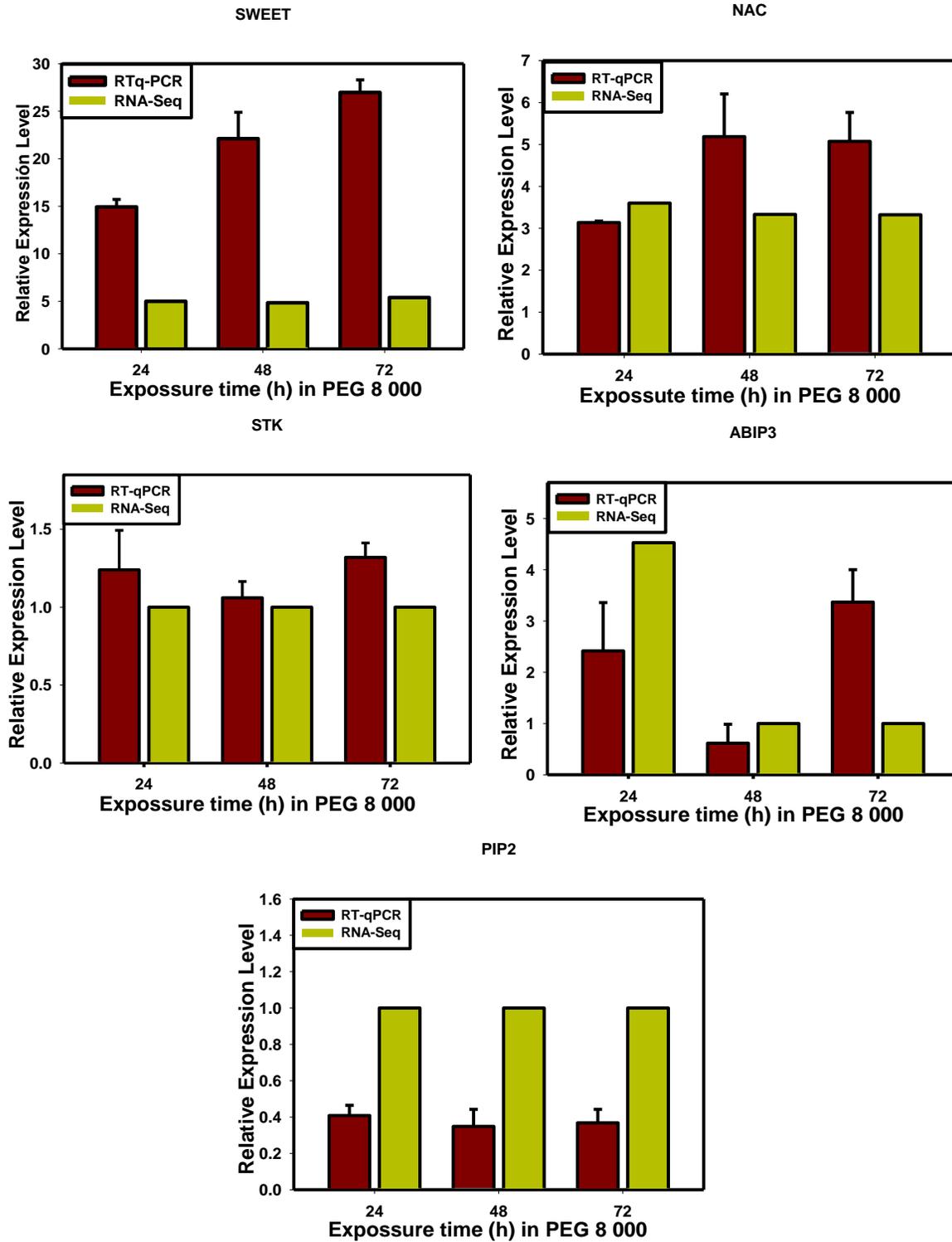


Figura 3.7 Cuantificación de la expresión relativa en raíz

Se realizó la cuantificación de la expresión génica en tejido de raíz en donde se apreció que para el caso de Sweet, la técnica RT-qPCR mostró una tendencia directamente proporcional a medida que aumenta el tiempo de exposición a estrés; no obstante, la tendencia de los niveles de expresión por RNA-seq se mantuvo inamovible en los tres tiempos. En la cuantificación para NAC, se apreció un comportamiento similar a las 24 horas de exposición tanto por RT-qPCR como por RNA-seq, sin embargo, por ésta última técnica, los niveles se mantuvieron poco cambiantes en contraste con la estimación para las 48 y 72 horas, respectivamente por RT-qPCR en donde se dio un aumento considerable respecto a las 24 horas.

En STK, por RT-qPCR se analizaron los niveles de expresión en donde la tendencia mostró un declive a las 48 horas de exposición de tal forma que los niveles de expresión fueron similares a los 24 y 72 horas; interesantemente por RNA-seq los niveles se mantuvieron constantes para todos los puntos de exposición a estrés. Para ABIP3, la expresión relativa por RT-qPCR mostró discrepancias respecto a RNA-seq ya que las veces de cambio después de las 24 horas descendieron al siguiente punto de las 48 horas para luego incrementar a las 72 horas; de manera contraria, por la otra técnica, se apreció un decremento sostenido en función del tiempo que fue de 4 veces a solo una.

La expresión relativa para PIP2 por ambas técnicas fue bastante interesante ya que, de manera particular cada una mantuvo inamovible sus niveles de expresión a pesar del tiempo transcurrido en estrés.

3.5 DISCUSIÓN

Las plantas tienen la capacidad de responder a una serie de estímulos externos a través de cambios a nivel celular y molecular, conllevando a una serie de reajustes que confieren defensa a la planta. La exposición a estrés conduce a una alteración de la homeostasis siendo la restauración de ésta regulada por la expresión y activación de ciertos genes (Suprasana 2011). Hasta ahora, la elucidación de los mecanismos moleculares en respuesta a estrés abiótico, salinidad en especial, son conocidos parcialmente dadas las limitaciones de genomas secuenciados y de transcriptomas; las tecnologías de secuenciación de última generación proveen de una plataforma eficiente y de bajo costo para analizar la expresión de genes, en particular de aquellas especies que no cuentan con un genoma de referencia (Jin *et al.*, 2016).

En lo que atañe a la genómica funcional de plantas, con el uso de las tecnologías de secuenciación de última generación (NGS), incluyendo plataformas como Roche/454, Illumina, entre otras, se han realizado análisis globales de la expresión génica (Wan *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015 y Sun *et al.*, 2011); ahora bien, se echa mano de las técnicas como el caso de qRT-PCR dada su precisión, sensibilidad y capacidades de alto rendimiento (Zaho *et al.*, 2015; Li X *et al.*, 2015; Li D *et al.*, 2015 y Caldana *et al.*, 2007).

En especies no modelo, como caña de azúcar, se han realizado trabajos para identificar molecularmente genes en respuesta a estrés, por mencionar algunos, se realizaron perfiles de expresión de 1, 545 genes en plantas que fueron expuestas a varios tipos de estrés abiótico (sequía, ácido abscísico, metil jasmonato, inanición por fosfato) así como biótico (herbivoría, bacterias endófitas) (Rocha *et al.* 2007). Por otra parte, Rodrigues *et al.*, 2011, hallaron 1,670 genes que se expresaron diferencialmente en plantas expuestas a déficit hídrico en donde un extenso grupo de vías metabólicas mostraron cambio alguno debido a la modulación de ciertos genes en función de las condiciones a las que fueron sometidas las plantas. (Rocha *et al.* 2007), de manera interesante el tratamiento de estrés por sequía fue el que causó más cambios a nivel transcriptómico en caña de azúcar.

Tomando como plataforma el proyecto SUEST, se han desarrollado proyectos con el fin de hallar genes en respuesta a estrés. Por medio de SuperSage se detectaron 8,787,315 tags, de 26 pb de las cuales se obtuvieron únicamente 205,975 unitags. De éstas, 118,280 se catalogaron por GO. La información obtenida provino de plantas sometidas a déficit hídrico por 24 horas en donde únicamente 213 genes tuvieron actividad transcripcional a la alza en respuesta a estrés abiótico (Kido *et al.*, 2012).

Tomando en cuenta los adelantos que se han dado en materia de secuenciación masiva, nuestros resultados distan por mucho de los obtenidos por Kido *et al.*, 2012 dado que obtuvimos 140,339 unigenes de 100 pb. De plantas sometidas a intervalos de 24 a 72 horas de estrés. Para efectos de análisis y agrupamiento por GO se tomaron 19,372 unigenes, de los cuales 231 mostraron actividad transcripcional a la alza en todos los tratamientos así como 95 que se compartieron en todos los tratamientos, los cuales mostraron actividad transcripcional a la baja.

En lo que respecta a nuestros resultados usando la tecnología RNA-seq, presentamos un rendimiento por encima del reportado por Cardoso-Silva *et al.*, en el 2014, con 72,269 unigenes ensamblados en donde analizaron 6 variedades de caña. Otro trabajo que se enfocó a analizar el proceso de abscisión en hojas, arrojó 275,018 transcritos ensamblados con un valor N50 de 1,177 pb (Li *et al.*, 2016)

Un aspecto a remarcar estriba en la contribución a la generación de conocimiento acerca de la respuesta a estrés osmótico en una variedad de importancia nacional. En lo que respecta a análisis transcriptómico, se investigaron 4 subfamilias de acuaporinas (PIP, TIP, SIP y NIP) descritas en otras especies de plantas superiores; 42 isoformas de acuaporinas se expresaron de cuatro bibliotecas por HT-Super Sage, las cuales fueron obtenidas al contrastar una variedad tolerante con una resistente a sequía siendo que el estudio al validarse por RT-qPCR arrojó que 10 isoformas fueron seleccionadas como candidatas a usarse en futuros trabajos de mejora genética (Da Silva *et al.*, 2013).

En contraste con nuestra investigación en donde vitroplantas de *S. officinarum* L. se sometieron a condiciones de estrés osmótico, dicha respuesta fue analizada desde las perspectivas fisiológicas, bioquímicas y moleculares, echando mano de la tecnología RNA-Seq de la plataforma Illumina, en donde se hallaron un total de 252,702 transcritos totales (unigenes con sus isoformas), de los cuales 140,339 correspondieron a unigenes; de éstos, se halló que 231 genes fueron diferencialmente expresados (GDE) tanto en hoja como en raíz en todos los tiempos, presentando una regulación a la alza. Otro aspecto que resalta es que se hallaron 536 GDE en hojas, no obstante, el mayor número de GDE se encontraron en raíz, siendo un total de 750. Resulta interesante que los GDE regulados negativamente tanto en hoja como en raíz fueron 95; no obstante, en hoja fueron 1,093 los GDE en contraste con 531 hallados en raíz; en lo que atañe a la anotación del transcriptoma en BLAST2GO mediante Gene Ontology (GO), arrojó que para el área de Procesos Metabólicos se encontraron 9,115 GDE se hallaron inmiscuidos en sustancias orgánicas

contrastando con la menor cifra de GDE para ésta área, que fueron de 1,386 involucrados en procesos de localización única.

Para el área de Componentes Celulares, se hallaron que 6, 778 GDE se relacionan con componentes intracelulares siendo que la menor cantidad de GDE fue de 1, 301 relacionados con la membrana plasmática; y, como parte última de la clasificación de la ontología génica, la anotación denotó que en Funciones Moleculares resaltaron 8,129 GDE implicados en compuestos orgánicos cíclicos contrastando con los 2,731 GDE involucrados en proteínas de unión

Ahora bien, en lo que atañe a la expresión diferencial se aprecia que existe una similitud en cuanto a la coloración de las bibliotecas testigo, 1 y 2 para hoja y 9 y 10 para raíz; aunado a que existe un marcado contraste en la regulación transcripcional entre hoja y raíz, siendo regulada a la alza en las bibliotecas de raíz, hecho que está re direccionado con el ajuste osmótico por parte de las células de raíz, tal como se reporta en (An et al., 2015)

Otro aspecto apreciado es que se obtuvieron un total de 140,339 unigenes, así como 252, 702 genes con sus respectivas isoformas; en comparación con 72, 269 unigenes anotados generados a partir de 400 millones de lecturas, los cuales dimanar de 6 genotipos de caña de azúcar con rasgos agronómicos deseables (Cardoso-Silva et al., 2014), hecho que se sustenta en la tecnología que fue usada para realizar el presente trabajo, secuenciación PE 2X100. De ahí la gran cantidad de datos generados. Por otro lado, se aprecian, en función de los diagramas de Venn, que existen genes, los cuales están presentes tanto en los tratamientos en hoja como en raíz.

El diagrama muestra que existen 231 genes que se expresan a la alza de manera continua tanto en hoja como en raíz, no obstante, solamente existen 95 genes que se expresan transcripcionalmente a la baja en todos los tratamientos en hoja como en raíz. A este tipo de genes se les conoce como tipo *core* dada su regulación y actividad transcripcional.

Ahora bien, con base a la ontología génica, se trifurcaron los unigenes en 3 grandes grupos: Procesos biológicos, Compuestos Celulares y Función Molecular. Contrastantemente, la mayor cantidad de unigenes se hallaron inmersos en procesos biológicos como en el área de los compuestos metabólicos (9115), por otra parte, en el apartado de compuestos celulares, se aprecia una cantidad considerable de unigenes (6778) involucrados en compuestos intracelulares y, finalmente en el área de la función molecular, se aprecian unigenes que subyacen en el área de compuestos orgánicos (8129).

En este apartado se pretende validar el transcriptoma mediante la selección de genes de interés, ahora bien, se decidió usar la técnica de RT-qPCR por su precisión y confiabilidad (Rapacz, 2013). Se realizaron pruebas para ambos tejidos (hoja y raíz) siendo que en hoja, para el caso de Sweet (Bidirectional sugar transporter SWEET6a-like) se aprecia que en la expresión relativa por RT-qPCR que va de un rango de entre casi 6 a 5, siendo que el comportamiento es inversamente proporcional que el obtenido por RNA-Seq, el cual va de 2 a casi 4 veces de expresión relativa con respecto al control.

En el caso de NAC (NAC transcription factor 25-like), el comportamiento obtenido por RT-qPCR va desde las 6 veces de cambio, incrementándose hasta casi 10 en el punto de 48 horas para luego disminuir a casi 6 veces de cambio a las 72 horas, con respecto al control; sin embargo, por RNA-Seq, las veces de cambio tendieron a aumentar, de 2 hasta 4 veces de razón de cambio en función del tiempo de exposición.

Ahora bien para STK (Serine threonine- kinase), el comportamiento es bastante distinto que los casos antes mencionados, dado que por RT-qPCR las veces de cambio no llegaron a la unidad siendo que para las 24 y 48 horas el comportamiento es bastante similar no así en las 72 horas de tratamiento, ya que tiende a decrecer el nivel de expresión; ahora bien, la expresión relativa por RNA-Seq arrojó un decremento en el nivel de expresión siendo que los valores fueron negativos y se hallaron en el rango de -3 a -4 veces, resultado que supone una mayor precisión por la técnica dado que por la gran cantidad de datos analizados las lecturas pueden variar en RNA-Seq.

Para el caso de ABIP3 (abscisic acid 8 -hydroxylase 3-like), las veces de cambio cuantificadas a través de RT-qPCR muestran una tendencia ascendente respecto a la unidad del control, sin embargo, las veces de cambio fueron bastante incipientes no llegando ni a la unidad, no obstante, el comportamiento por RNA-Seq fue proporcionalmente conspicuo ya que se mantuvo por encima de las 4 veces de cambio con un comportamiento de los gráficos similar demostrando con esto que no hay una expresión diferencial en este tejido bajo efectos del PEG.

Para PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), las veces de cambio reportadas con las desviaciones estándar, que se mantuvieron por debajo de la unidad presentando un decreciente en función del tiempo, siendo este comportamiento de los gráficos bastante similar por RNA-Seq, no obstante las veces de cambio fueron en decremento desde las 3.4 veces hasta la unidad misma. Para el caso del análisis en raíz, los comportamientos fueron notoriamente contrastantes. En la cuantificación de la expresión relativa para el caso de

Sweet, por RT-qPCR se aprecia un comportamiento directamente proporcional en función del tiempo de exposición, dado que de 1.5 veces se llegó a casi 3 veces de cambio siendo que por RNA-Seq no se presentó un cambio significativamente visible ya que se mantuvieron casi en el mismo rango, lo cual indica que en estas condiciones particulares (estrés osmótico a la altura de la radícula) no hubo una expresión diferencial.

En el caso de NAC, en el primer punto resultó un tanto incipiente en comparación con el dato obtenido por RNA-Seq; no obstante, el comportamiento para los puntos restantes fue similar, ubicándose en 3 veces de cambio, ahora bien, el comportamiento distinto mostrado por RT-qPCR que para los puntos restantes, las veces de cambio se situaron por encima de las 5 veces de cambio. Evaluando el comportamiento de STK, se aprecia que existe una variación incipiente determinada a través de RT-qPCR, las cuales fueron de 1.2, 1.0 a 1.3 veces de cambio respecto a la unidad; no obstante, los datos arrojados por RNA-Seq denotan que no hay expresión diferencial para las condiciones dadas, lo cual indica que hay una leve expresión diferencial cuantificada por RT-qPCR.

En lo que concierne a la evaluación para ABIP3, existe un contraste notorio en el primer punto dado que por RT-qPCR de muestran 2 veces de cambio, siendo que por RNA-Seq esa cantidad es duplicada, ahora bien, para 48 horas (segundo punto) hay una reducción hasta de 1.5 veces siendo que el transcriptoma arrojó para ese punto y para el de 72 horas una expresión de 1 unidad, no así para las 72 horas por RT-qPCR ya que se aprecia un aumento significativo de 3.5 veces de cambio, lo cual indica que para efectos de éste gene y en las condiciones particulares, por RNA-Seq solo hay expresión diferencial a las 24 horas.

Las veces de cambio percibidas a través de ambas herramientas mostraron un comportamiento similar, ya que por RT-qPCR las veces de cambio en todos los puntos subyacen por debajo de las 0.4 veces de cambio siendo que los datos arrojados por el transcriptoma se sitúan en la unidad, lo cual nos indica que para efectos de la interpretación de los datos mediante el transcriptoma, no existe una expresión diferencial en este caso particular.

En lo que respecta a Sweet, se sabe de su papel, como proteínas involucradas en el transporte de azúcares facilitando su difusión a través de las membranas celulares en función de un gradiente de concentración así como en el desarrollo del polen, producción de néctar y crecimiento del tubo polínico (Baker *et al.*, 2012)

Aunque desde la perspectiva evolutiva se sabe poco acerca de éstas proteínas en plantas se presume su implicación en el desarrollo de estrategias adaptativas en plantas terrestres; sin embargo y aplicando su enfoque a los resultados de expresión relativa se aprecia una mayor expresión en raíz que en hoja dado que quizá esto se redirecciones al ajuste osmótico que a su vez se aprecia, aunado a lo antes descrito, osmolitos como la hexosa promueven la expansión de las células a través de la actividad de invertasas vacuolares, influyendo en la turgencia celular (Wang *et al.*, 2010; Barbier,*et al.*,2015)

Las proteínas NAC constituyen una de las familias de factores de transcripción en ampliamente diversificado en plantas (Olsen *et al.*, 2005) las cuales se manifiestan en un amplio rango de estímulos, no obstante, estreses de tipo abiótico han demostrado una activación de dichos factores transcripcionales en especies tales como *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum* entre otros (Meng *et al.*, 2009). Para ambos gráficos, tanto para hoja como para raíz, el comportamiento denota una expresión acorde con lo esperado ya que conforme transcurre el tiempo de exposición, la expresión tiende a aumentar.

Con la finalidad de condensar la información acerca de la expresión génica por RT-qPCR versus RNA-Seq, se muestran un par de tablas en donde se aprecian los valores obtenidos por cada técnica.

Cuadro 3.1 Niveles de expresión génica mediante RT-qPCR versus RNA-Seq en tejido de raíz de *S. officinarum* L. cv mex 6990

GEN	TEJIDO	RT-qPCR	RNA-Seq
PIP2	RAÍZ	0.408	1
PIP2	RAÍZ	0.3483	1
PIP2	RAÍZ	0.3677	1
ABIP3	RAÍZ	2.4158	4.5276
ABIP3	RAÍZ	0.6148	1
ABIP3	RAÍZ	3.3694	1
STK	RAÍZ	1.2397	1
STK	RAÍZ	1.0609	1
STK	RAÍZ	1.3195	1
NAC	RAÍZ	3.1365	3.6003
NAC	RAÍZ	5.1852	3.3293
NAC	RAÍZ	5.0718	3.3221
SWEET	RAÍZ	14.9285	5.0021
SWEET	RAÍZ	22.1127	4.8448
SWEET	RAÍZ	26.9709	5.3947

Cuadro 3.2 Niveles de expresión génica mediante RT-qPCR versus RNA-Seq en tejido de hoja de *S. officinarum* L. cv mex 6990

GEN	TEJIDO	RT-qPCR	RNA-Seq
PIP2	HOJA	0.4692	3.4131
PIP2	HOJA	0.3667	2.1473
PIP2	HOJA	0.1822	1
ABIP3	HOJA	0.362	4.4538
ABIP3	HOJA	0.498	4.2311
ABIP3	HOJA	0.6529	4.4136
STK	HOJA	0.6731	-3.4003
STK	HOJA	0.7346	-3.8228
STK	HOJA	0.3716	-3.7233
NAC	HOJA	7.8899	2.9564
NAC	HOJA	9.4261	3.4143
NAC	HOJA	6.3511	4.6969
SWEET	HOJA	5.9244	2.9697
SWEET	HOJA	5.6308	3.5186
SWEET	HOJA	5.0364	4.4968

3.6 CONCLUSIONES

Con fundamento en los resultados obtenidos a partir del análisis transcriptómico, de los con 252,702 genes con sus respectivas isoformas, se hallaron 140,339 unigenes los cuales fueron mapeados contra la base de datos GO, siendo que un total de 19,372 unigenes se catalogaron en función de 29 subcategorías pertenecientes a 3 principales categorías, las cuales fueron: procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. Cabe señalar que se apreció una patrón de expresión diferencial del tipo tejido-específico dado que para los DEGs a la alza en todos los tratamientos, en hojas se expresaron 536 y en raíz 750, de los cuales solamente 231 se comparten en común de estos dos tejidos.

Para los DEGs con actividad transcripcional a la baja, se halló que 1093 se expresan en hoja siendo que en raíz existen 531, de los cuales solamente 95 se comparten en común de estos dos tejidos.

Con la validación del transcriptoma de caña por RT-qPCR comparado con RNA-Seq y dadas las condiciones particulares de la presente investigación, se permite externar con bases experimentales sólidas siguiendo la tendencia de la literatura científica, que existe una correlación entre los datos obtenidos con ambas técnicas ya que en ambos tejidos las tendencias para cada caso en particular presentaban un comportamiento aceptable.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES GENERALES

4.1 CONCLUSIONES

La importancia de estudiar el efecto de diversos tipos de estrés abiótico en plantas estriba en dilucidar los mecanismos que son activados para salvaguardar la integridad del organismo, mitigar su efecto o bien permitir su recuperación. Tales mecanismos son involucran una serie de regulaciones génicas que a su vez median respuestas bioquímicas y fisiológicas que han sido ampliamente estudiados (Asensi-Fabado *et al.*, 2016; Gahlaut *et al.*, 2016) siendo el estrés por sequía el que origina cierta gama de respuestas que vienen mediadas por la frecuencia y magnitud de la exposición (Rodríguez *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014) dado que es uno de los factores que inciden fatídicamente en el desarrollo y rendimiento de cultivos a escala mundial (Mittler y Blumwald, 2010; Shanker *et al.*, 2014).

Cuando se presentan tensiones del tipo osmótico y/o sequía, las plantas responden articulando la regulación de la expresión de ciertos genes que conllevan a la homeostasis (Komatsu y Hossain, 2013). Actualmente, el desarrollo e implementación de las tecnologías de vanguardia, en la actual era de las disciplinas ómicas, como las NGS, que permiten hallar una cantidad considerable genes relacionados con el estrés, lo cual se direcciona a usarse como una plataforma para el mejoramiento genético de especies de interés comercial, como lo es el caso de *S. officinarum* L. En la presente investigación se describe la respuesta, desde diversas perspectivas, de vitroplantas de caña de azúcar cv. MEX 69-290 sometidas a shock osmótico (-4.5 MPa) las cuales contaban con 90 días de mantenerse en condiciones habituales en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) para luego experimentar y analizar las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares a 24, 48 y 72 horas de exposición a PEG, respectivamente, contando con su debido testigo de plantas no estresadas (0 horas).

Los datos arrojados en lo que concierne a las pruebas fisiológicas demuestran que existe una correlación directamente proporcional en función del tiempo de exposición al agente estresante de tal manera que aspectos como el CRA en tejidos de hoja, a las 72 horas, decreció poco más del 31% respecto al control, siendo que en trabajos reportados, se demuestran una reducción en este parámetro alrededor del 33% en plantas de

aproximadamente 5 meses de edad ante un déficit hídrico de 9 días (Li et al., 2016); otro aspecto relacionado con las mediciones fue acerca de lo inherente a los procesos fotosintéticos ya que cuando existe déficit hídrico, la percepción y señalización conducen a cambios en la expresión génica así como en la oclusión estomática que está en función de las propiedades hidráulicas en elementos como el xilema (Osakabe et al., 2013). Estas características se redireccionan al comportamiento de los gráficos de asimilación neta de CO₂ así como la tasa de transpiración ya que ambos tienden a decrecer en función del tiempo de exposición a estrés percibiéndose un cambio significativo en la tasa de asimilación de CO₂ así como en la transpiración después de haber transcurrido 48 horas, razón por la cual se podría pensar en una posible degradación de los pigmentos fotosintéticos que podrían tener un efecto negativo en la capacidad fotosintética, específicamente a nivel del complejo del PSII (Cha-Um et al., 2012), siendo que la tasa fotosintética tiende a decrecer en función del potencial hídrico de la planta.

En lo que atañe al ajuste osmótico de manera significativa se dio a las 24 horas de exposición a PEG en donde el contenido de prolina en tejido de raíz aumentó de manera considerable si se compara con los niveles de acumulación en tejido de hoja, en donde el contenido fue mucho mayor (6 veces) a las 72 horas en comparación al testigo, lo cual se correlaciona con el proceso del ajuste osmótico, siendo los resultados bastante acordes con trabajos previos en la especie en cuestión, (Cha-Um & Kirdmanee, 2008; Li et al., 2016; Zhou et al., 2012). Suriyan y Chalermopol, 2009, demuestran un comportamiento similar en cuanto al contenido de prolina se refiere en vitroplantas (cv K84-200) cuando fueron sometidas a estrés por manitol (-1.2 MPa) durante 7 días; además, Li et al., 2016, obtuvieron resultados de mediciones fisiológicas hechas al cv GT21, en donde se apreciaron alteraciones en respuesta al estrés por sequía.

Con base a lo antes mencionado, los datos derivados de la medición a parámetros fisiológicos, presumiblemente sugieren que existen variaciones significativas en la regulación de elementos moleculares que originan las respuestas fisiológicas mediadas por la percepción del estrés originado por imposición a PEG, el cual tiende a ser usado debido a que origina condiciones similares a la sequía en tanto en condiciones *ex vitro* e *in vitro* dado a que es un agente osmótico inerte no penetrante, no presenta fitotoxicidad para el tejido, así como a la capacidad de reducir el potencial osmótico del medio de cultivo, lo cual

origina un estrés del tipo osmótico en las células vegetales cultivadas (Kaufmann, 1973; Munir y Aftab, 2009).

Para la realización del presente trabajo se echó mano de herramientas como el cultivo de tejidos, ya que son implementadas dado que permiten homogeneizar el universo muestral promoviendo un desarrollo sincrónico que puede ser bastante controlado (Errabii et al., 2006; Munir y Aftab, 2009). Con el fin de ahondar en lo tocante a las intrincadas redes de regulación molecular en función de la respuesta del estrés osmótico en caña de azúcar, se realizó un ensamble *de novo*, en el cual se hallaron 252,702 unigenes, de los cuales se hallaron 140,339 unigenes (53.53%), siendo los resultados comparables con los obtenidos por Li *et al.*, 2016, en donde hallaron un total de 164,803 unigenes de 6 variedades de caña de azúcar (4 híbridos y 2 cultivares parentales).

Un total de 11,796 genes presentaron regulación diferencial en hoja siendo que para el tejido de raíz se hallaron 8,611 genes; con el análisis de componentes principales, así como el agrupamiento jerárquico se apreció patrones de expresión tejido-específico de los DEGs de tal forma que se apreciaron cambios significativos en el patrón de expresión en ambos tejidos después de las 24 horas de exposición a estrés, los cuales son evidentes en el patrón del mapa de calor. Por otra parte, las muestras con las que se comparan, las no estresadas, presentaron un patrón de expresión bastante similar.

Los grupos E-G (con 452,161 y 31 genes) mostraron un cambio rápido en el patrón de expresión en el T1 mostrando pequeñas variaciones en las muestras de 48 y 72 horas respectivamente. Con base a lo antes mencionado, acorde con las observaciones realizadas en la realización del presente trabajo y bajo condiciones particulares durante su consecución se concluye que existe una expresión diferencial en función del tiempo de exposición, a su vez, la fenotipificación de las vitroplantas sometidas a estrés osmótico obedece a los resultados de las mediciones a parámetros fisiológicos y bioquímicos, meramente como experimentos correlativos, datos que apoyan el patrón de expresión de los DEGs.

4.2 PERSPECTIVAS

Con la finalidad de incrementar el nivel de comprensión de caña de azúcar en respuesta a estrés abiótico, se sugiere la aplicación de técnicas y/o herramientas que permitirán conseguir el objetivo planteado, así como servir de plataforma para futuros trabajos de mejora genética de éste cultivar con gran potencial biotecnológico.

Con la transformación genética (mediada por *Agrobacterium* o biobalística) a nivel de callos embriogénicos, embriones somáticos, meristemos apicales o a nivel de semilla, con genes de interés obtenidos a partir del análisis transcriptómico se podría incrementar el nivel de conocimientos bioquímicos y moleculares en caña de azúcar (Kim *et al.*, 2012; Taparia *et al.*, 2012; Zale *et al.*, 2016).

Al efectuar estudios para detallar la dinámica del agua a nivel de tejido en plantas genéticamente transformadas, se podrían realizar ensayos no destructivos usando técnicas como la espectroscopía en Tera Hertz, con lo cual se obtendría información útil para dilucidar la asimilación y compartimentación de moléculas de agua (Castro-Camus *et al.*, 2013; Gente *et al.*, 2013). Con el diseño, desarrollo y aplicación de experimentos como ensayos histoquímicos, microscopía confocal y/o de barrido, se podrían comprender aspectos de superlativa importancia en lo que atañe a biología del desarrollo como lo es la arquitectura de la raíz (Bisseling y Scheres, 2014)

Con la selección y análisis de genes que codifican para proteínas de interés, como el caso del doble transportador Sweet, se encontraría información útil acerca de su funcionalidad e interacción con aspectos tales como la dinámica de azúcares (Braun, 2012; Chen *et al.*, 2012). Aunado a lo antes descrito, al llevar a cabo estudios bioinformáticos enfocados a evolución y filogenia, se podría hallar información acerca de eventos evolutivos de genes que codifican a proteínas de interés (Sweet, NAC, DREB, dehidrinas).

Además, al correlacionar y consolidar la plataforma obtenida a partir del transcriptoma con análisis proteómicos y metabolómicos, se lograría obtener un recurso integral para la mejora genética de este cultivar (Ristova *et al.*, 2016). Por último, se sugiere dar seguimiento al proyecto de tal manera que en un futuro próximo se puedan implementar los conocimientos obtenidos a partir de observaciones y experimentaciones al campo cañero mexicano, con la finalidad de solucionar los problemas inherentes a este componente productivo del sector primario.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S. R., Ahmad, S. D., Sabir, S. M., & Shah, A. H. (2014). Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation , antioxidant activity , glycine-betaine and proline contents, *14*(1), 233–243.
<http://doi.org/10.4067/S0718-95162014005000019>
- Aguilar-rivera, N., Armend, C., García, C. A., & García-trevi, E. S. (2016). Carbon footprint of sugar production in Mexico, *112*, 2632–2641.
<http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.113>
- Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lutz C, Lutz-Meindl U (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *J Exp Bot* 60: 939–954.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–10.
[http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- An, X., Chen, J., Zhang, J., Liao, Y., Dai, L., Wang, B., ... Peng, D. (2015). Transcriptome profiling and identification of transcription factors in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) in response to PEG treatment, using illumina paired-end sequencing technology. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(2), 3493–3511.
<http://doi.org/10.3390/ijms16023493>
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*; 64: 5245–5250.
- Arruda P (2001) Sugarcane transcriptome: a landmark in plant genomics in the tropics. *Genet Mol Biol* 24:1–296
- Arruda, P., Silva, T. R. (2007). Transcriptome analysis of the sugarcane genome for crop improvement. *Genomics-Assisted Crop Improvement*, *2*, 483–494.
http://doi.org/10.1007/978-1-4020-6297-1_18
- Arruda, P. (2012). Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. *Current*

Opinion in Biotechnology. Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.012>

Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>

Asensi-Fabado, M. A., Amtmann, A., & Perrella, G. (2016). Plant responses to abiotic stress: The chromatin context of transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(1), 106–122. <http://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.07.015>

Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008) *Fundamentos de Fisiología Vegetal Interamericana*-McGraw-Hill, Madrid

Baker R.F., Leach K.A., Braun D.M. (2012). Sweet as sugar: New Sucrose Effluxers in Plants. *Molecular Plant*. Volume 5, Issue 4. 766-768.

Bankar, K. G., Todur, V. N., Shukla, R. N., & Vasudevan, M. (2015). Ameliorated de novo transcriptome assembly using Illumina paired end sequence data with Trinity Assembler. *Genomics Data*, 5, 352–359. <http://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.07.012>

Barbier, F., Lunn, J. E., & Beveridge, C. A. (n.d.). ScienceDirect Ready , steady , go ! A sugar hit starts the race to shoot branching Franc. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.004>

Barros, P., Soares-cavalcanti, N. M., Vieira-de-melo, G. S., & Benko-iseppon, A. M. (2011). Osmoprotectants in the Sugarcane (*Saccharum spp* .) Transcriptome Revealed by in Silico Evaluation, 44–58.

Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23–58. <http://doi.org/10.1080/07352680590910410>

Begcy, K., Mariano, E. D., Gentile, A., Lembke, C. G., Zingaretti, S. M., Souza, G. M., & Menossi, M. (2012). A Novel Stress-Induced Sugarcane Gene Confers Tolerance to Drought, Salt and Oxidative Stress in Transgenic Tobacco Plants. *PLoS ONE*, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044697>

Bello-Bello, J., Poot-Poot, W., Iglesias-Andreu, L., Caamal-Velázquez, H., & Diaz-Sanchez, M. C. (2014). Comparison of effect of osmoregulators and growth inhibitors on in vitro conservation of sugarcane | Comparación del efecto de osmorreguladores

e inhibidores del crecimiento en la conservación in vitro de caña de azúcar.

Agrociencia, 48(4), 439–446.

Bertoncini, E. I., Guirado, N., Chaila, S., Arévalo, R. A., Los términos cultivar o variedad de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA [en línea] 2006, 12 (enero-junio): [Fecha de consulta: 20 de febrero de 2017] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912102>> ISSN 1027-152X

Bisseling, T., & Scheres, B. (2014). Nutrient computation for root architecture. *Science*, 346(6207), 300–301. <http://doi.org/10.1126/science.1260942>

Boaretto, L. F., Carvalho, G., Borgo, L., Creste, S., Landell, M. G. A., Mazzafera, P., & Azevedo, R. A. (2014). Plant Physiology and Biochemistry Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology et Biochemistry*, 74, 165–175. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.11.016>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Bower, R., Elliott, A. R., Potier, B. A. M., & Birch, R. G. (1996). High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Molecular Breeding*, 2(3), 239–249. <http://doi.org/10.1007/BF00564201>

Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443–448

Braun, D. M. (2012). SWEET! The Pathway Is Complete. *Science*, 335(6065), 173–174. <http://doi.org/10.1126/science.1216828>

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.*; 55: 611-622

Buchanan, Bob-B Wilhelm Grissem, and R. L. J. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. (and R. L. J. Bob B. Buchanan, Wilhelm Grissem, Ed.). The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK: 2015 by John Wiley & Sons, Ltd Registered.

Brown, M.E. and Funk, C.C. (2008) Climate. Food security under climate change. *Science*

- Bower, R., Elliott, A. R., Potier, B. A. M., & Birch, R. G. (1996). High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Molecular Breeding*, 2(3), 239–249. <http://doi.org/10.1007/BF00564201>
- Bustamante, H. (1986). Potencial del agua del suelo., 39(2), 27–38. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/29716/1/28345-101390-1-PB.pdf>
- Caldana C, Scheible WR, Mueller-Roeber B, Ruzicic S. (2007). A quantitative RT-PCR platform for highthroughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods.*; 3: 7.
- Cardoso-Silva, C. B., Costa, E. A., Mancini, M. C., Balsalobre, T. W. A., Costa Canesin, L. E., Pinto, L. R., ... Vicentini, R. (2014). De novo assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. *PLoS ONE*, 9(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0088462>
- Carson DL, Botha FC (2000) Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. *Crop Sci* 40:1769–1779.
- Casu RE, Dimmock CM, Chapman SC, Grof CPL, McIntyre CL, Bonnett GD, Manners JM (2004) Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Mol Biol* 54:503–517.
- Castañeda-Castro, O., Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., & Pastelín-Solano, M. C. (2015). Osmotic stress induced by polyethylene-glycol alters macronutrient concentrations in sugarcane (*Saccharum spp.*) plants in vitro. *Agrociencia*, 49(8), 859–873.
- Castro-Camus, E., Palomar, M., & Covarrubias, a a. (2013). Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored in-vivo using terahertz time-domain spectroscopy. *Scientific Reports*, 3, 2910. <http://doi.org/10.1038/srep02910>
- Cha-Um, S., & Kirdmanee, C. (2008). Effect of osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth of sugarcane plantlets (*saccharum officinarum L.*). *Pakistan Journal of Botany*, 40(6), 2541–2552.
- Cha-Um, S., Wangmoon, S., Mongkolsiriwatana, C., Ashraf, M., & Kirdmanee, C. (2012). Evaluating sugarcane (*Saccharum sp.*) cultivars for water deficit tolerance using

-
- some key physiological markers. *Plant Biotechnology*, 29(5), 431–439.
<http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.12.0726a>
- Chaumont, F., & Tyerman, S. D. (2014). Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. *Plant Physiology*, 164(4), 1600–1618.
<http://doi.org/10.1104/pp.113.233791>
- Chávez, L. y González, L. M. (2009). Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. ITEA, vol. 105, no. 4, p. 231-256.
- Chávez-Suárez L y Ramírez Fernández R. (2010). Mecanismos de transducción de señales en plantas afectadas por salinidad y sequía. ITEA (2010), Vol. 106 (3), 157-169.
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., ... Münch, E. (2012). Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*, 335(6065), 207–211. <http://doi.org/10.1126/science.1213351>
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J.-K. (2006). Salt Stress Signaling and Mechanisms of Plant Salt Tolerance. *Genetic Engineering*, 27(2), 141–177. http://doi.org/10.1007/0-387-25856-6_9
- Chinnusamy V, Zhu JK, Sunkar R. (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology* 639: 39–55.
- Core, L.; J. Waterfall; J. Lis. (2008). Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science* 322: 1845-1848, EE.UU.
- Covarrubias A. (2007). Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología*, V14 CS3. Indd: 253-262.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). *Abscisic acid: emergence of a core signaling network*. *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 61). <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R. 82005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*; 139: 5–17.
- De Araujo, P. G., Rossi, M., De Jesus, E. M., Saccaro, N. L., Kajihara, D., Massa, R., ... Sluys, M. A. V. (2005). Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid

-
- sugarcane. *Plant Journal*, *44*(5), 707–717. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02579.x>
- Dedemo, G., Rodrigues, F., & Roberto, P. (2013). Osmoprotection in Sugarcane under Water Deficit Conditions. *Plant Stress*, *7*(1), 1–7. Retrieved from [http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/PS_7\(1\)1-7o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/PS_7(1)1-7o.pdf)
- D'Hont, A., Souza, G., Menossi, M., Vincentz, M., Van-Sluys, M.-A., Glaszmann, J., & Ulian, E. (2008). Sugarcane: A Major Source of Sweetness, Alcohol, and Bio-energy. *Genomics of Tropical Crop Plants*, *1*, 483–513. http://doi.org/10.1007/978-0-387-71219-2_21
- De Setta, N., Monteiro-Vitorello, C. B., Metcalfe, C. J., Cruz, G. M. Q., Del Bem, L. E., Vicentini, R., ... Van Sluys, M.-A. (2014). Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. *BMC Genomics*, *15*, 540. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-540>
- Dong, S., Delucca, P., Geijskes, R. J., Ke, J., Mayo, K., & Dunder, E. (2014). Advances in Agrobacterium -Mediated Sugarcane Transformation and Stable Transgene Expression, *16*(4), 366–371. <http://doi.org/10.1007/s12355-013-0294-x>
- Eldessoky, D. S., Ismail, R. M., Abdel-Hadi, A.-H. a, & Abdallah, N. a. (2011). Establishment of regeneration and transformation system of sugarcane cultivar GT54-9 (C9). *GM Crops*, *2*(2), 126–34. <http://doi.org/10.4161/gmcr.2.2.17288>
- Errabii, T., Gandonou, C. B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M., & Skali Senhaji, N. (2007). Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum sp.*) callus cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, *29*(2), 95–102. <http://doi.org/10.1007/s11738-006-0006-1>
- Errabii, T., Gandonou, C. C. B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M., & Skali-senhaji, N. (2006). Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of ...*, *5*(August), 1488–1493. Retrieved from <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/43144>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2012). *Agronoticias America Latina y el Caribe*.

-
- Felix, J. D. M., Papini-terzi, F. S., Rocha, F. R., Ulian, E. C., Souza, G. M., & Menossi, M. (2009). Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregating for Sugar Content, 98–109. <http://doi.org/10.1007/s12042-009-9031-8>
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 11, e0166. <http://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Flores, C. S. 2001. Las Variedades de Caña de Azúcar en México. Ed. ATAM. México. 308 p.
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coggill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H., ... Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database, 36(November 2007), 281–288. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm960>
- Gahlaut, V., Jaiswal, V., Kumar, A., & Gupta, P. K. (2016). Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 129(11), 2019–2042. <http://doi.org/10.1007/s00122-016-2794-z>
- Gao, D. H. Y., & Chen, Y. G. Z. (2016). Transcriptome of High-Sucrose Sugarcane Variety GT35. *Sugar Tech*. <http://doi.org/10.1007/s12355-015-0420-z>
- Gente, R., Born, N., Voß, N., Sannemann, W., Léon, J., Koch, M., & Castro-Camus, E. (2013). Determination of leaf water content from terahertz time-domain spectroscopic data. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 34(3–4), 316–323. <http://doi.org/10.1007/s10762-013-9972-8>
- Gulledge, A.; A. Roberts; H. Vora; K. Patel; A. Loraine. (2012). Mining *Arabidopsis thaliana* RNA-Seq Data with Integrated Genome Browser Reveals Stress-Induced Alternative Splicing of the Putative Splicing Regulator SR45A. *American Journal of Botany* 99 (2): 219- 231, EE.UU.
- Gosal, S. S., Wani, S. H., & Kang, M. S. (2009). Biotechnology and Drought Tolerance. *Journal of Crop Improvement*, 23(1), 19–54. <http://doi.org/10.1080/15427520802418251>
- Góngora-Castillo, E., & Buell, C. R. (2013). Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference

-
- genome sequence. *Natural Product Reports*, 30(4), 490–500.
<http://doi.org/10.1039/c3np20099j>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–52.
<http://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Gupta, V., Raghuvanshi, S., Gupta, A., & Saini, N. (2010). The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane, 207–214. <http://doi.org/10.1007/s10142-009-0144-9>
- Gzik, A. (1996). Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 36(1), 29–38. [http://doi.org/10.1016/0098-8472\(95\)00046-1](http://doi.org/10.1016/0098-8472(95)00046-1)
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456–66. <http://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 66(2), 300–372.
<http://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300>
- Hrishikesh Upadhyaya, Lingaraj Sahoo, and S. K., & Panda. (2013). Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. In G. R. Rout & A. B. Das (Eds.), *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 179–192). <http://doi.org/10.1007/978-81-322-0807-5>
- Huang, H., Mcgarvey, P., Mazumder, R., & Wu, C. H. (2007). Databases and ontologies UniRef : comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters, 23(10), 1282–1288. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm098>
- Imadi, S. R., Kazi, A. G., Ahanger, M. A., Gucel, S., & Ahmad, P. (2015). Plant transcriptomics and responses to environmental stress: an overview. *Journal of Genetics*, 94(3), 525–537. <http://doi.org/10.1007/s12041-015-0545-6>
- Jian-Kang Zhu , Paul M. Hasegawa, R. A. B. & P. H. J. B. (1997). Jian-Kang Zhu , Paul M. Hasegawa , Ray A. Bressan & Professor Hans J. Bohnert (1997) Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16:3, 253-277Critical

Reviews in Plant Sciences Molecular Aspects of Osmotic Stress in, 2689(March 2013), 37–41. <http://doi.org/10.1080/07352689709701950>

Jin, H., Dong, D., Yang, Q., & Zhu, D. (2016). Salt-Responsive Transcriptome Profiling of *Suaeda glauca* via RNA Sequencing, 1–14.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0150504>

Jordán, M., Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento : Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. *Fiología Vegetal*, 16, 28. <http://doi.org/10.1007/s00299-004-0843-6>

Kaufmann, M. R. (1973). The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 60001, 51(5), 914–916.

Kerlavage, K. (1991). Complementary DNA Sequencing : Expressed Sequence Tags and Human Genome Project, 49(1990).

Kido, É. A., Ferreira Neto, J. R. C., Silva, R. L. D. O., Pandolfi, V., Guimarães, A. C. R., Veiga, D. T., ... Benko-Iseppon, A. M. (2012). New Insights in the Sugarcane Transcriptome Responding to Drought Stress as Revealed by Supersage. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–14. <http://doi.org/10.1100/2012/821062>

Kielbowicz-Matuk, A., Rey, P., & Rorat, T. (2014). Interplay between circadian rhythm, time of the day and osmotic stress constraints in the regulation of the expression of a *Solanum Double B-box* gene. *Annals of Botany*, 113(5), 831–842.

<http://doi.org/10.1093/aob/mct303>

Kim, J. Y., Gallo, M., & Altpeter, F. (2012). Analysis of transgene integration and expression following biolistic transfer of different quantities of minimal expression cassette into sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(2), 297–302. <http://doi.org/10.1007/s11240-011-0043-3>

Knight, H. (1999). Calcium Signaling during Abiotic Stress in Plants. *International Review of Cytology*, 195, 269–324. [http://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62707-2](http://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62707-2)

Komatsu, S., & Hossain, Z. (2013). Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Frontiers in Plant Science*, 4(April), 71. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00071>

Kumar, T., Khan, M. R., Abbas, Z., & Ali, G. M. (2014). Genetic Improvement of

Sugarcane for Drought and Salinity Stress Tolerance Using Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase, 199–209. <http://doi.org/10.1007/s12033-013-9695-z>

Lawlor, D. W. (1970). Absorption Of Polyethylene Glycols By Plants And Their Effects On Plant Growth. *New Phytologist*, 69(2), 501–513. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1970.tb02446.x>

Lane, R., Silva, D. O., Daniel, M., Nardi, C. H. De, & Ribamar, J. (2011). Validation of Novel Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative Real-time PCR in drought- stressed Sugarcane, 2014.

Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current Protocols in Bioinformatics*, (SUPP.32), 1–14. <http://doi.org/10.1002/0471250953.bi1107s32>

Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25: 275–294.

Li, B., Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 323. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>

Li, C., Nong, Q., Solanki, M. K., Liang, Q., Xie, J., Liu, X., ... Li, Y. (2016). Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. *Scientific Reports*, 6(April), 25698. <http://doi.org/10.1038/srep25698>

Li D, Ono N, Sato T, Sugiura T, Altaf-UI-Amin M, Ohta D, et al. (2015). Targeted Integration of RNA-Seq and Metabolite Data to Elucidate Curcuminoid Biosynthesis in Four Curcuma Species. *Plant Cell Physiol.*; 56(5):843–851.

Li X, Zhang D, Li H, Gao B, Yang H, Zhang Y, et al. (2015). Characterization of reference genes for RT-qPCR in the desert moss *Syntrichia caninervis* in response to abiotic stress and desiccation/rehydration. *Front Plant Sci.*; 6: 38.

Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold , salinity and drought stresses : An overview, 444, 139–158. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>

Marchler-Bauer, A., & Bryant, S. H. (2004). CD-Search: Protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 327–331.

<http://doi.org/10.1093/nar/gkh454>

Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., ... Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D222–D226. <http://doi.org/10.1093/nar/gku1221>

Mattiello, L., Riaño-Pachón, D. M., Martins, M. C. M., da Cruz, L. P., Bassi, D., Marchiori, Menossi, M. (2015). Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. *BMC Plant Biology*, 15(1), 300. <http://doi.org/10.1186/s12870-015-0694-z>

Maybank J, Bonsal BR, Jones J, Lawford RG, O'Brien EG, et al. (1995) Drought as a natural disaster. *Atmosphere-Ocean* 33: 195–222

Medeiros, D. B., Ciríaco, E., Silva, D., Jurema, R., Nogueira, M. C., Teixeira, M. M., & Silveira Buckeridge, M. (2013). Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(3), 213–222.

Meng, C., Cai, C., Zhang, T., & Guo, W. (2009). Plant Science Characterization of six novel NAC genes and their responses to abiotic stresses in *Gossypium hirsutum* L., 176, 352–359.

Menossi, M., Vincentz, M., & Souza, G. M. (2008). Sugarcane Functional Genomics : Gene Discovery for Agronomic Trait Development, 2008. <http://doi.org/10.1155/2008/458732>

Mishra, N. S., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants, 452, 55–68. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2006.05.001>

Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 443–62. <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112116>

Mochida, K., & Shinozaki, K. (2010). Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. *Plant and Cell Physiology*, 51(4), 497–523. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcq027>

Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., De Campos, M. K. F., De Carvalho, J. F. R. P., Filho, J. C. B., ... Vieira, L. G. E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production

-
- of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 130(2), 218–229.
<http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00909.x>
- Morozova, O., Hirst, M., & Marra, M. A. (2009). Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. <http://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-145957>
- Munir, N., & Aftab, F. (2009). The role of polyethylene glycol (PEG) pretreatment in improving sugarcane's salt (NaCl) tolerance. *Turkish Journal of Botany*, 33(6), 407–415. <http://doi.org/10.3906/bot-0806-6>
- Murelli, C., Rizza, F., Albini, F. M., Dulio, A., Terzi, V., & Cattivelli, L. (1995). Metabolic changes associated with cold acclimation in contrasting cultivars of barley. *Physiologia Plantarum*, 94(1), 87–93. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00788.x>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
<http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Myhre, S., Tveit, H., Mollestad, T., & Lægreid, A. (2006). Additional Gene Ontology structure for improved biological reasoning. *Bioinformatics*, 22(16), 2020–2027.
<http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl334>
- Nagalakshmi, U., Waern, K., & Snyder, M. (2010). RNA-Seq : A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis, (January), 1–13.
<http://doi.org/10.1002/0471142727.mb0411s89>
- Orvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., & Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 23(6), 785–794.
<http://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00845.x>
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25(2), 609–624.
<http://doi.org/10.1105/tpc.112.105700>

-
- Pandey, R., & Agarwal, R. M. (1998). Water Stress-induced Changes in Proline Contents and Nitrate Reductase Activity in Rice Under Light and Dark Conditions. *Water*, 4, 53–57. Retrieved from http://www.geocities.ws/pmbp_india/sample.pdf
- Papini-Terzi, F. S., Rocha, F. R., Vêncio, R. Z. N., Felix, J. M., Branco, D. S., Waclawovsky, A. J., ... Souza, G. M. (2009). Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics*, 10, 120. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-120>
- Passioura J.B.. (1997). Grain yield, harvest index and water use of wheat, *J. Aust. Agric. Sci.* 43 117–121.
- Prabu, G., Kwar, P. G. (2011). Identification of Water Deficit Stress Upregulated Genes in Sugarcane, 291–304. <http://doi.org/10.1007/s11105-010-0230-0>
- Patade, V. Y., Bhargava, S., & Suprasanna, P. (2012). Halopriming mediated salt and iso-osmotic PEG stress tolerance and, gene expression profiling in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Molecular Biology Reports*, 39(10), 9563–9572. <http://doi.org/10.1007/s11033-012-1821-7>
- Pence, V. C., J. A. Sandoval, V. M. Villalobos, and F. Engelmann. 2002. In vitro collecting techniques for germplasm conservation. IPGRI Tech. Bull. No. 7. 87 p.
- Queiroz, R. J. B., Santos, D. M. M. Dos, Ferraudo, A. S., Carlin, S. D., & Silva, M. D. A. (2011). Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies. *Scientia Agricola*, 68(4), 469–476. <http://doi.org/10.1590/S0103-90162011000400012>
- Rai, M. K., Shekhawat, N. S., Harish, Gupta, A. K., Phulwaria, M., Ram, K., & Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: A review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2), 179–190. <http://doi.org/10.1007/s11240-011-9923-9>
- Rajashekar, C. B., & Lafta, A. (1996). Cell-wall changes and cell tension in response to cold acclimation and exogenous abscisic acid in leaves and cell cultures. *Plant Physiology*, 111(2), 605–612. <http://doi.org/10.1104/pp.111.2.605>
- Rangel-Estrada, S. E., Hernández-Meneses, E. (2016). Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México micropropagation of sugarcane varieties grown in México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(3), 225–231.

-
- Rao, S., & Ftz, J. (2013). In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L .), 19(June), 261–268. <http://doi.org/10.1007/s12298-013-0162-x>
- Rao, X., Lu, N., Li, G., Nakashima, J., Tang, Y., & Dixon, R. A. (2016). Comparative cell-specific transcriptomics reveals differentiation of C4 photosynthesis pathways in switchgrass and other C4 lineages. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1649–1662. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv553>
- Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR, 391–406. <http://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Reis, R. R., Andrade Dias Brito da Cunha, B., Martins, P. K., Martins, M. T. B., Alekcevetch, J. C., Chalfun-Júnior, A., ... Molinari, H. B. C. (2014). Induced over-expression of *AtDREB2A* CA improves drought tolerance in sugarcane. *Plant Science*, 221–222, 59–68. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.003>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rocha, F. R., Papini-Terzi, F. S., Nishiyama, M. Y., Vêncio, R. Z. N., Vicentini, R., Duarte, R. D. C., Souza, G. M. (2007). Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics*, 8, 71. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-71>
- Rodríguez, M., Canales, E., Borroto, C. J., Carmona, E., López, J., Pujol, M., & Borrás-Hidalgo, O. (2006). Identification of genes induced upon water-deficit stress in a drought-tolerant rice cultivar. *Journal of Plant Physiology*, 163(5), 577–584. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.07.005>
- Rodrigues, F. A., Da Graca, J. P., De Laia, M. L., Nhani-Jr, A., Galbiati, J. A., Ferro, M. I. T., Zingaretti, S. M. (2011). Sugarcane genes differentially expressed during water deficit. *Biologia Plantarum*, 55(1), 43–53. <http://doi.org/10.1007/s10535-011-0006-x>
- Rodrigues, F. A., de Laia, M. L., & Zingaretti, S. M. (2009). Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science*, 176(2), 286–302. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.11.007>

-
- Rodríguez-Pérez, L. (2006). Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas
Physiological implications of osmoregulation in plants. *Agronomía Colombiana*, 24(1),
28–37.
- Ristova, D., Carré, C., Pervent, M., Medici, A., Kim, G. J., Scalia, D., ... Krouk, G. (2016).
Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to
nitrogen and hormones in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science Signaling*, 9(451), 1–
11. <http://doi.org/10.1126/scisignal.aaf2768>
- Rose R., Gleenson F.G., Atkinson M.(1993). Morphological and water stress
characteristics of three Douglas fir stock types in relation to seedling performance
under different soil moisture condition. *New For.* 7 1–17
- Ruan W, Lai M. (2007). Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta*; 385: 1–
5.
- Rucker K.S., Kevin C.K, Holbrook C.C., Hook J..E., (1995). Identification of peanut
genotypes with improved drought avoidance traits, *Peanut Sci.* 22. 14–18.
- Sadras V.O, Connor D.J., Whitfield D.M.. (1993). Yield, yield components and source–sink
relationship in water stressed sunflower, *Field Crop Res.* 31 27–39.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping
gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Bioph
Meth.*; 46: 69–81.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2003). Molecular
responses to drought, salinity and frost: Common and different paths for plant
protection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 194–199.
[http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00030-2](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00030-2)
- Setta, D., Setta, N. De, Monteiro-vitorello, C. B., Metcalfe, C. J., Marcelo, G., & Cruz, Q.
(2014). Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary
trends Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary
trends.
- Sentíes-Herrera, H. E., Gómez-Merini, F. C., Valdéz-Balero, A., Silva-Rojas, H. V., &
Trejo-Téllez, L. I. (2014). Agro-Industrial Sugarcane System in Mexico: Current
Status. Challenges and Opportunities. *Journal of Agricultural Science*, 7(2), 27.

<http://doi.org/10.5539/jas.v6n4p26>

- Shanker, A. K., Maheswari, M., Yadav, S. K., & Desai, S. (2014). Drought stress responses in crops, 11–22. <http://doi.org/10.1007/s10142-013-0356-x>
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus - Biologies*. <http://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.01.002>
- Shavrukov, Y. (2012). Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 119–127. <http://doi.org/10.1093/jxb/err313>
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217–223.
- Shubhra J.D., Ooswami C.L. (2003). Effect of phosphorus application on growth, chlorophyll and proline under water deficit in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub), *Indian J. Plant Physiol.* 8 150–154
- Silva-Robledo, H., Ortiz-Lizana, M., & Acevedo-Hinojosa, E. (2006). Hydric Relationship and Osmotic Adjustment in Wheat. *Agrociencia*, 41(1), 23–34. Retrieved from <http://eurekamag.com/research/012/917/hydric-relationships-osmotic-adjustment-wheat.php>
- Snyman, S. J., Meyer, G. M., Richards, J. M., Haricharan, N., Ramgareeb, S., & Hockett, B. I. (2006). Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: Effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cell Reports*, 25(10), 1016–1023. <http://doi.org/10.1007/s00299-006-0148-z>
- Solari LI, Johnson S, DeJong TM (2006) Relationship of water status to vegetative growth and leaf gas exchange of peach (*Prunus persica*) trees on different rootstocks. *Tree Physiol* 26: 1333–1341.
- Soni, P., Rizwan, M., Bhatt, K. V, Mohapatra, T., & Singh, G. (2011). In-vitro response of *Vigna aconitifolia* to drought stress induced by to drought stress induced by PEG - 6000. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(3), 108–121.
- Stein, H., Honig, A., Miller, G., Erster, O., Eilenberg, H., Csonka, L. N., ... Zilberstein, A.

-
- (2011). Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. *Plant Science*, 181(2), 140–150. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.013>
- Steuter, A. A., Mozafar, A., Goodin, J. O. E. R., Mozafar, A., & Goodin, J. O. E. R. (1981). Water Potential of Aqueous Polyethylene Glycol. *Plant Physiology*, 67(1), 64–7. <http://doi.org/10.1104/pp.67.1.64>
- Sugiharto, B., Ermawati, N., Mori, H., Aoki, K., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaya, T., ... Sakakibara, H. (2002). Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant & Cell Physiology*, 43(3), 350–354.
- Sun Y, Luo H, Li Y, Sun C, Song J, Niu Y, et al. (2011). Pyrosequencing of the *Camptotheca acuminata* transcriptome reveals putative genes involved in camptothecin biosynthesis and transport. *BMC Genomics*.; 12: 533.
- Suprasanna, P., Patade, V. Y., Desai, N. S., Devarumath, R. M., Kawar, P. G., Pagariya, M. C., Babu, K. H. (2011). Biotechnological Developments in Sugarcane Improvement : An Overview, 13(December), 322–335. <http://doi.org/10.1007/s12355-011-0103-3>
- Suriyan, C. um, & Chalernpol, K. (2009). Proline Accumulation, Photosynthetic Abilities and Growth Characters of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Plantlets in Response to Iso-Osmotic Salt and Water-Deficit Stress. *Agricultural Sciences in China*, 8(1), 51–58. [http://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60008-0](http://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60008-0)
- Székely, G., Ábrahám, E., Csépló, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., ... Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal*, 53(1), 11–28. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x>
- Tang, J. S. Wang. (1941). A thermodynamic formulation of the cell water relations in an isolated living cell. *J. Phys. Chem.*, 45(3), 443–453. <http://doi.org/10.1021/j150408a010>
- Taparia, Y., Gallo, M., & Altpeter, F. (2012). Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111(2),

131–141. <http://doi.org/10.1007/s11240-012-0177-y>

- Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang G-L, Xu Z-S, Xiong A-S. (2015). Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS One.*; 10 (2): e0117569.
- Trapnell, C., Pachter, L., & Salzberg, S. L. (2009). TopHat : discovering splice junctions with RNA-Seq, 25(9), 1105–1111. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Baren, M. J. Van, ... Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 516–520. <http://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2001). Plant histidine kinases: an emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2001(December 2007), re18. <http://doi.org/10.1126/stke.2001.109.re18>
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, 35(4), 753–759. <http://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Vettore, L., Silva, F. R., Kemper, E. L., Souza, G. M., Silva, A. M., Ine, M., ... Pedrosa, G. (2003). Analysis and Functional Annotation of an Expressed Sequence Tag Collection for Tropical Crop Sugarcane, (November), 2725–2735. <http://doi.org/10.1101/gr.1532103>
- Waclawovsky, A. J., Sato, P. M., Lembke, C. G., Moore, P. H., & Souza, G. M. (2010). Sugarcane for bioenergy production: An assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnology Journal*, 8(3), 263–276. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00491.x>
- Ward, J. A., Ponnala, L., & Weber, C. A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany*, 99(2), 267–276. <http://doi.org/10.3732/ajb.1100334>
- Wang L, Li X-R, Lian H, Ni D-A, He Y, Chen X-Y, Ruan Y-L: Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and Arabidopsis root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively. *Plant Physiol* 2010,

154:744-756.

- Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J. (2002). Cell Signaling during Cold , Drought , and Salt Stress, 165–184. <http://doi.org/10.1105/tpc.000596.S166>
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance To Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 781–803. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>
- Yang, Z. B., Eticha, D., Fühns, H., Heintz, D., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A., ... Horst, W. J. (2013). Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5569–5586. <http://doi.org/10.1093/jxb/ert328>
- Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 133–139. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.009>
- Zale, J., Jung, J. H., Kim, J. Y., Pathak, B., Karan, R., Liu, H., ... Altpeter, F. (2016). Metabolic engineering of sugarcane to accumulate energy-dense triacylglycerols in vegetative biomass, 661–669. <http://doi.org/10.1111/pbi.12411>
- Zdobnov, E. M., & Apweiler, R. (2001). InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17(9), 847–848. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.9.847>
- Zhang, M., Lv, D., Ge, P., Bian, Y., Chen, G., Zhu, G., ... Yan, Y. (2014). Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteomics*, 109, 290–308. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.010>
- Zhao Y, Luo J, Xu S, Wang W, Liu T, Han C, et al. (2016) Selection of Reference Genes for Gene Expression Normalization in *Peucedanum praeruptorum* Dunn under Abiotic Stresses, Hormone Treatments and Different Tissues. PLoS ONE 11(3).
- Zhou, G., Yang, L. T., Li, Y. R., Zou, C. L., Huang, L. P., Qiu, L. H., ... Srivastava, M. K. (2012). Proteomic Analysis of Osmotic Stress-Responsive Proteins in Sugarcane Leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(2), 349–359.

<http://doi.org/10.1007/s11105-011-0343-0>

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.*

Zhong Wang, Mark Gerstein, M. S. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.*, 10(1), 57–63. <http://doi.org/10.1038/nrg2484.RNA-Seq>

Zingaretti, S. M., Rodrigues, F. A., da Graça, J. P., Pereira, L. D. M., & Lourenço, M. V. (2012). Sugarcane Responses at Water Deficit Conditions. *Water Stress*, 255–276. <http://doi.org/10.5772/1419>