



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA VÍA DE REGULACIÓN MEDIADA POR microRNAs DURANTE  
DÉFICIT HÍDRICO EN *Marchantia polymorpha*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
ALMA JENNY GARCÍA MEJÍA

DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Leonor Pérez Martínez  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Berenice García Ponce de León  
[Instituto de Ecología, UNAM](#)

Cuernavaca Morelos., Agosto, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Estudio de la Respuesta a Déficit Hídrico del consorcio Covarrubias-Reyes, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. José Luis Reyes Taboada.



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Financiado parcialmente por fondos de los proyectos CONACyT (CB2010-151571) y DGAPA-PAPIIT (IN-205112 e IN-202918).

## Reconocimientos

**Al CONACyT por la beca otorgada.**

Al **Dr. Mario Arteaga** (Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana) y a la Unidad Universitaria de Apoyo Bioinformático por el análisis de la secuenciación de microRNAs en *M. polymorpha*.

A la **Lic. Rosa María Solórzano** por su apoyo técnico en el laboratorio durante la realización de este proyecto.

A la **Dra. Damaris Godínez Vidal** por su valioso apoyo para la implementación de las condiciones de cultivo, mantenimiento, diseño de condiciones de estrés en esta planta modelo, por su amabilidad y convivencia durante esta etapa.

A la **Dra. Berenice García Ponce de León** y a la **Dra. Leonor Pérez Martínez** por sus valiosas aportaciones y críticas que acompañaron el desarrollo de este proyecto como miembros del comité tutorial.

Al **Dr. Juan Carlos Martínez Morales** por su valioso apoyo en la revisión de la ortografía y redacción de este manuscrito.

A los miembros del Jurado por la lectura y corrección de este manuscrito y sus valiosas aportaciones.

## **Agradecimientos**

A mi familia. Gracias a mi papá, mi mamá y mi hermana porque a pesar de la distancia los llevo en mi corazón.

A mis compañeros del laboratorio en particular a **María Beatriz Pérez Morales** por su amistad y solidaridad. Siempre te agradeceré.

Al **Dr. Ramiro González Garza** por su amable apoyo.

A Benjamín y Zaira por la terapia grupal involuntaria que improvisamos mientras continuaba con la escritura de la tesis.

A Pulga, a China y sobre todo a Frijol, mis perritas, mis compañeras en este periodo.

# *Ami Frijol*



2018-2023

## Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de 21 a 24 nucleótidos que actúan a nivel postranscripcional regulando negativamente sus transcritos blanco. Se ha documentado que los miRNAs participan en diversos procesos, entre los cuales se encuentra la respuesta a diversos tipos de estrés hídrico en plantas vasculares; sin embargo, aún se sabe poco de su participación en la regulación de las respuestas al estrés abiótico en plantas no vasculares.

*Marchantia polymorpha* es una planta no vascular de la división de las hepáticas (Marchantiophyta), el grupo más basal del linaje de las plantas terrestres (Embriophyta). Su corto ciclo de vida con una fase dominante haploide y su posición filogenética la han convertido en un interesante modelo de estudio. A pesar de su anatomía sencilla, *M. polymorpha* coloniza ambientes diversos, algunos de los cuales presentan condiciones que inducen el déficit hídrico vegetal, por ejemplo, la falta de agua y la salinidad. Estudiar sus mecanismos para enfrentarse a la falta de agua en el medio resulta importante, debido a que la sequía es el principal factor que afecta la productividad en los cultivos. La salinidad asociada a la sequía causa déficit hídrico en plantas vasculares, pero ha sido poco documentada en plantas no vasculares por lo que resulta de interés conocer los mecanismos que les permiten sobrevivir o adaptarse al estrés hídrico, en particular, los mecanismos de regulación mediados por miRNAs.

El principal objetivo del proyecto fue identificar los miRNAs que responden a estrés salino en talos de *M. polymorpha*. En principio, se caracterizó la respuesta morfológica y algunos parámetros fisiológicos durante la exposición a estrés salino en *M. polymorpha* y se analizó el efecto del tratamiento con ácido abscísico (ABA), una fitohormona considerada el regulador central de la respuesta a estrés en plantas. Posteriormente, mediante secuenciación masiva se identificaron los miRNAs que se acumularon diferencialmente en respuesta al estrés salino y se comprobó la acumulación de algunos miRNAs mediante RT-qPCR.

Se trataron talos de 7 días de edad con tres concentraciones de NaCl: 150 250 y 500 mM. En los tres casos se observó clorosis y pérdida de turgencia en la zona central del talo, se observó la relocalización de los cloroplastos hacia la periferia celular debido principalmente a cambios en la vacuola central, la disminución del peso fresco de los talos y del potencial osmótico celular. Además, se registró el aumento en la acumulación del mRNA

de la *LEA7*, una proteína que participa en la respuesta a estrés en plantas vasculares. De manera interesante, los talos mantienen la fotosíntesis activa durante el tratamiento con NaCl 150 mM y no con los tratamientos con NaCl 250 o 500 mM. En cuanto al tratamiento con la fitohormona ABA, se encontró que la exposición a medio que contenía concentraciones de ABA de 1, 5 o 10  $\mu$ M, no afectó negativamente el talo, sin embargo, indujo la relocalización de los cloroplastos. En la literatura se ha mostrado que el pretratamiento con ABA exógeno permite a los talos de *M. polymorpha* contender con la deshidratación, por lo que los talos pretratados con ABA, se expusieron subsecuentemente a NaCl 150 mM. Se observó un efecto de protección en cuanto a los efectos observables del NaCl, pero no se observó que impidiera el decremento en el potencial osmótico ni la pérdida de agua.

A continuación, se identificaron los miRNAs diferencialmente expresados en respuesta al tratamiento con NaCl 150 y 250 mM mediante secuenciación masiva. Se identificaron 60 miRNAs compartidos entre las tres bibliotecas (control, NaCl 150 y 250 mM) y 59 miRNAs diferencialmente expresados en respuesta al tratamiento con NaCl. Sólo dos miRNAs encontrados se conservan a lo largo de las plantas terrestres, el miR166 y el miR319. Se seleccionaron seis miRNAs de *M. polymorpha* para evaluar su acumulación mediante RT-qPCR durante los tratamientos con NaCl. Este análisis indicó que miR319 aumenta su acumulación y miR11742 baja su acumulación en respuesta al tratamiento con NaCl 150 mM. Por otro lado, miR166, miR529, y miR11753 no se acumularon diferencialmente y miR11732 no se detectó mediante RT-qPCR. Un trabajo independiente del grupo validó los dos blancos propuestos para miR319 en *M. polymorpha*: el mRNA de *RWP-RK DOMAIN CONTAINING* (MpRKD) y el mRNA de *MYB FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR 33* (MpMYB33). Se encontró que los transcritos de MpRKD y de MpMYB33 disminuyen su acumulación en los tratamientos con NaCl 150 y 250 mM. Esto sugiere que este miR319 participa en la respuesta a estrés salino en *M. polymorpha*, a través de un rol poco conocido en tejidos vegetativos que puede ser distintivo del papel en el que participa durante los procesos de reproducción sexual en los que se ha encontrado asociado, por lo que este puede constituir un interesante módulo de respuesta al estrés salino.

## Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs of 21 to 24 nt in length that act regulating their target mRNAs at the post-transcriptional level. It has been documented that miRNAs participate in various processes, including the response to different types of water stress in vascular plants. However, little is still known about their contribution in non-vascular plants.

*Marchantia polymorpha* is a non-vascular plant belonging to the liverwort division (Marchantiophyta), the most basal group of the land plant lineage (Embriophyta). Its short life cycle with a dominant haploid phase and its phylogenetic position have turned it into an interesting model for research. Despite its simple anatomy, *M. polymorpha* colonizes diverse environments, some of which expose it to conditions inducing water deficit, such as water scarcity and salinity. To study their mechanisms to cope with adverse environmental cues is relevant because the drought and its effects are the main factors affecting plant productivity. While salinity associated with drought induces water deficit in vascular plants, this phenomenon has been scarcely documented in non-vascular plants. Thus, understanding the mechanisms enabling their survival or adaptation to water stress, particularly those involving miRNA-mediated regulation, is of significant interest.

The main objective of the project was to identify miRNAs responding to saline stress in *M. polymorpha* thalli. Initially, the morphological response and certain physiological parameters during exposure to saline stress in *M. polymorpha* were characterized, and the effect of abscisic acid (ABA) treatment was analyzed. ABA is a phytohormone considered the central regulator of stress response in plants. Subsequently, using deep sequencing, differentially accumulated miRNAs in response to saline stress were identified, and the accumulation of some miRNAs was confirmed through RT-qPCR.

Thalli at 7 days of age were treated with three NaCl concentrations: 150, 250, and 500 mM. In all cases, chlorosis and loss of turgidity were observed in the central region of the thallus. Relocation of chloroplasts toward the cellular periphery was primarily due to changes in the central vacuole. Additionally, the thalli experienced a decrease in fresh weight and cellular osmotic potential. Moreover, there was an increase in the accumulation of LEA7 mRNA, a protein participating in stress response in vascular plants. Interestingly, thalli

maintained active photosynthesis during treatment with 150 mM NaCl, but not during treatments with 250 or 500 mM NaCl. On the other hand, the treatment with ABA concentrations of 1, 5, or 10  $\mu$ M did not adversely affect the thallus; however, it induced chloroplast relocation. The literature demonstrates that pre-treatment with exogenous ABA enables *M. polymorpha* thalli to cope with dehydration. Therefore, ABA-pre-treated thalli were subsequently exposed to 150 mM NaCl. A protective effect of ABA treatments against observable NaCl effects was noted, but it did not prevent the decrease in osmotic potential or water loss.

Subsequently, differentially expressed miRNAs in response to 150 or 250 mM NaCl treatments were identified using deep sequencing. Sixty miRNAs were shared among the three libraries (control, NaCl 150, and 250 mM), and fifty-nine miRNAs were differentially expressed in response to NaCl treatment. Only two found miRNAs are conserved across terrestrial plants: miR166 and miR319. Six miRNAs from *M. polymorpha* were selected to evaluate their accumulation through RT-qPCR during NaCl treatments. This analysis indicated that miR319 increased its accumulation, while miR11742 decreased its accumulation in response to 150 mM NaCl treatment. On the other hand, miR166, miR529, and miR11753 did not differentially accumulate, and miR11732 was not detected through RT-qPCR. An independent study by the group validated the proposed targets for miR319 in *M. polymorpha*: the mRNA of RWP-RK DOMAIN CONTAINING (MpRKD) and the mRNA of MYB FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR 33 (MpMYB33). Transcripts of MpRKD and MpMYB33 were found to decrease in accumulation during treatments with 150 and 250 mM NaCl. This suggests that miR319 participates in salt stress response in *M. polymorpha*, playing a lesser-known role in vegetative tissues, which may differ from its role during sexual reproduction processes it has been associated with in vascular plants. Consequently, this might constitute an interesting module in the salt stress response.

## Tabla de Contenido

Reconocimientos .....	3
Agradecimientos.....	4
Resumen .....	6
Abstract.....	8
Figuras .....	13
Tablas .....	14
Lista de abreviaturas .....	15
1 Introducción.....	17
1.1 <i>Marchantia polymorpha</i> , una briofita.....	17
1.1.1 Morfología de <i>M. polymorpha</i> .....	18
1.1.2 Reproducción de <i>M. polymorpha</i> .....	20
1.1.3 Situación filogenética de <i>M. polymorpha</i> .....	22
1.2 La salinidad genera déficit hídrico en las plantas .....	25
1.3 Las plantas responden al estrés .....	27
1.3.1 Respuestas morfológicas, fisiológicas y moleculares.....	27
1.3.2 Respuesta al estrés hídrico en briofitas.....	29
1.3.3 ABA, integrador de la respuesta al estrés .....	32
1.4 Los miRNAs participan en la respuesta a estrés .....	35
1.4.1 Biogénesis de los miRNAs .....	35
1.4.2 miRNAs y estrés .....	38
2 Antecedentes.....	40
3 Hipótesis .....	46
4 Objetivos.....	46
5 Materiales y Métodos .....	47
5.1 Cultivo y propagación de <i>M. polymorpha</i> .....	47
5.2 Tratamiento de talos con NaCl y ABA .....	47
5.3 Microscopía.....	48
5.4 Evaluación de la tasa fotosintética .....	48
5.5 Evaluación del potencial osmótico.....	50
5.6 Identificación de miRNAs que participan en estrés salino .....	50
5.6.1 Material biológico.....	50
5.6.2 Obtención de RNA .....	51
	10

5.6.3	Secuenciación masiva y análisis de los resultados .....	52
5.7	Cuantificación de la acumulación relativa de miRNAs y mRNAs .....	56
5.7.1	Estandarización de las condiciones de amplificación.....	56
5.7.2	Obtención de cDNA para mRNAs .....	57
5.7.3	Obtención de cDNA para miRNAs .....	57
5.7.4	Cuantificación de mRNAs blanco .....	58
5.7.5	Cuantificación de miRNAs.....	59
5.7.6	Análisis de datos .....	60
6	Resultados.....	61
6.1	Respuesta morfológica de talos de <i>M. polymorpha</i> durante estrés salino.....	61
6.2	Algunos parámetros fisiológicos de la respuesta a estrés salino.....	64
6.2.1	Tasa fotosintética .....	64
6.2.2	Evaluación del potencial osmótico .....	66
6.2.3	Evaluación del peso fresco y peso seco .....	67
6.3	Efecto del ABA en de <i>M. polymorpha</i> .....	69
6.3.1	Morfología del talo en respuesta al ABA .....	70
6.3.2	Algunos parámetros fisiológicos de la respuesta a ABA.....	75
6.4	Análisis de la respuesta mediada por miRNAs durante estrés salino .....	79
6.4.1	Acumulación del mRNA de la MpLEA 7.....	80
6.4.2	Acumulación relativa de los transcritos de <i>DCLI</i> y <i>AGO1</i> en respuesta a estrés salino .....	81
6.4.3	Identificación de miRNAs mediante secuenciación masiva.....	84
6.4.4	Comprobación de algunos miRNAs por RT-qPCR.....	91
6.4.5	Acumulación relativa de mRNA de MpMYB33 y MpRKD, blancos de miR319.....	97
7	Discusión .....	99
7.1	El estrés salino causa cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares en <i>M. polymorpha</i> .....	102
7.2	El papel del ABA en la respuesta a estrés en <i>M. polymorpha</i> y su vínculo con los miRNAs .....	107
7.3	Participación de los miRNAs en respuesta al estrés salino en <i>M. polymorpha</i> . .	111
8	Conclusiones.....	120
9	Perspectivas .....	122
10	Referencias .....	123

Anexo A Medio de cultivo .....	131
Anexo B Tasa fotosintética .....	132
I Sistema para evaluar la tasa fotosintética .....	132
II Tasa de consumo de CO <sub>2</sub> (parte 1) .....	133
II Tasa de consumo de CO <sub>2</sub> (parte 2) .....	134
Anexo C Secuencia de los oligonucleótidos empleados .....	135
I Oligonucleótidos usados para amplificar miRNAs .....	135
II Oligonucleótidos empleados para amplificar mRNAs .....	136
Anexo D Análisis tipo BLAST del miR11732, 11742 y 11753 .....	137
Anexo E Lecturas normalizadas de los miRNAs encontrados .....	138

## Figuras

Figura 1.1 Corte transversal del talo de <i>M. polymorpha</i> . .....	20
Figura 1.2 Ciclo de reproducción asexual de <i>M. polymorpha</i> . .....	22
Figura 1.3 Biogénesis de los miRNAs y efecto sobre sus mRNAs blanco. ....	37
Figura 2.1 Talos de <i>M. polymorpha</i> sometidos a estrés salino. ....	45
Figura 6.1 Efecto de diferentes concentraciones de NaCl en <i>M. polymorpha</i> . ....	62
Figura 6.2 Relocalización de cloroplastos inducida por la exposición a diferentes concentraciones de NaCl. ....	63
Figura 6.3 Tasa fotosintética neta ( $\mu\text{mol CO}_2 * \text{g}^{-1} * \text{s}^{-1}$ ) evaluada en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl. ....	65
Figura 6.4. Potencial osmótico en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl. ....	66
Figura 6.5 Pérdida de agua en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl. ....	68
Figura 6.6 Efecto del tratamiento con ABA y exposición a NaCl 150 mM. ....	71
Figura 6.7 Relocalización de los cloroplastos en talos tratados con ABA. ....	73
Figura 6.8 Relocalización de los cloroplastos en talos tratados con ABA y pretratados con ABA y expuestos posteriormente a NaCl 150 mM. ....	74
Figura 6.9 Tasa fotosintética neta ( $\mu\text{mol CO}_2 * \text{g}^{-1} * \text{s}^{-1}$ ) evaluada en talos tratados con ABA y pretratados con ABA y posteriormente expuestos a NaCl 150 mM. ....	75
Figura 6.10 Potencial osmótico en talos tratados con diferentes concentraciones de ABA y posteriormente expuestos a NaCl 150 mM. ....	76
Figura 6.11 Evaluación del peso fresco y peso seco en los talos tratados con diferentes concentraciones de ABA y en los talos tratados con ABA expuestos posteriormente a NaCl 150 mM. ....	78
Figura 6.12 Acumulación relativa del mRNA del MpLEA7 en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl. ....	81
Figura 6.13 Acumulación relativa del mRNA del MpAGO1 y del mRNA del MpDCL1 en talos expuestos a NaCl. ....	82
Figura 6.14 Acumulación relativa de miR166, miR319 y miR529 en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM. ....	93
Figura 6.15 Acumulación relativa de miR11742 y miR11753 en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM. ....	95
Figura 6.16 Acumulación relativa de los transcritos de MpRKD y de MpMYB33 en talos expuestos a NaCl 150 y 250 mM. ....	98

## Tablas

Tabla 2.1 miRNAs de <i>M. polymorpha</i> , conservación en otros linajes, mRNAs blanco y participación en estrés en otras plantas (Parte 1).....	42
Tabla 2.1 miRNAs de <i>M. polymorpha</i> , conservación en otros linajes, mRNAs blanco y participación en estrés en otras plantas (Parte 2).....	43
Tabla 2.1 miRNAs de <i>M. polymorpha</i> , conservación en otros linajes, mRNAs blanco y participación en estrés en otras plantas (Parte 3).....	44
Tabla 5.1 Categorización de miRNAs expresados diferencialmente .....	54
Tabla 5.2 Reacción pulsada de RT .....	58
Tabla 5.3 Ciclos de amplificación para mensajeros .....	59
Tabla 5.4 Ciclos de amplificación para miRNAs .....	59
Tabla 6.1 Numero de secuencias y miRNAs encontrados mediante secuenciación en cada réplica independiente .....	85
Tabla 6.2 Número de miRNAs identificados en cada análisis pareado.....	86
Tabla 6.3 miRNAs de <i>M. polymorpha</i> identificados por secuenciación masiva y su acumulación durante estrés salino (parte 1) .....	87
Tabla 6.3 miRNAs de <i>M. polymorpha</i> identificados por secuenciación masiva y su acumulación durante estrés salino (parte 2) .....	88
Tabla 6.3 miRNAs de <i>M. polymorpha</i> identificados por secuenciación masiva y su acumulación durante estrés salino (parte 3) .....	89
Tabla 6.4 miRNAs seleccionados para analizar mediante RT-qPCR .....	92
Tabla 7.1 Resumen de resultados .....	100

## Lista de abreviaturas

ABA	Ácido Absísico
ABFs	ABRE BINDING FACTORS, motivo ABRE, <i>ABA response element</i> , elemento de respuesta a ABA
ABI1 y 2	ABA INSENSITIVE 1 y 2, enzimas PP2C
ABI3	ABA INSENSITIVE 3, FT
CBP20 y 80	CAP-BINDING PROTEIN 20 y 80
cDNA	DNA complementario
CHLH	MG-CHELATASE H SUBUNIT
CPL	C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE
CRISPR-Cas9	repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas asociada a la proteína 9
CRM1	CHROMOSOMAL MAINTENANCE 1, EXPORTIN 1
CSD1	SUPEROXIDE DISMUTASE Cu-Zn 1, superóxido dismutasa Cu-Zn 1
CT	Ciclo umbral
DCL1	DICER-LIKE1
DDL	DAWDLE
MpEF1 $\alpha$	<i>M. polymorpha</i> ELONGATION FACTOR 1 $\alpha$
ERO	Especies reactivas del oxígeno.
FCA	FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN A <sub>1</sub>
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	Factor de Transcripción
FY	FLOWERING LOCUS Y
GB	Glicinbetaina.
GPCR	G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR
G-Protein	GUANINE NUCLEOTIDE (G)-BINDING PROTEIN
GRC2	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 2
GTG1 y 2	GPCR-TYPE G PROTEIN 1 y 2
HD-ZIP III	Class III HOMEODOMAIN LEUCINE-ZIPPER
HEN1	HUA ENHANCER 1
HSP90	HEAT SHOCK PROTEIN 90
HYL1	HYPONASTIC LEAVES 1
IRGA	Infra Red Gas Analyzer, analizador de gases infrarrojo
KAT1	K channel from <i>Arabidopsis thaliana</i> , canal de potasio de <i>A. thaliana</i>
LEA	LATE EMBRIOGÉNESIS ABUNDAN PROTEIN
miRNA	microRNA
MpABI3A	<i>M. polymorpha</i> ABA INSENSITIVE 5B, FT
MpABI5B	<i>M. polymorpha</i> ABA INSENSITIVE 5B, FT
MpLEA7	<i>M. polymorpha</i> LATE EMBRIOGÉNESIS ABUNDAN PROTEIN 7
MpR2R3-MYB17	<i>M. polymorpha</i> R2R3 family MYB DOMAIN PROTEIN 17
MYB33 y 101	MYB FAMILY TRANSCRIPTION FACTOR 33 y 101
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFYA	NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR Y SUBUNIT A
PEG	Polietilenglicol
PP2C	PROTEIN PHOSPHATASE 2C, proteína fosfatasa tipo 2C
Pri-miRNA	miRNA primario
Pro	Prolina
PSI	Photosystem I, Fotosistema I.
PSII	Photosystem II, Fotosistema II.
PYL	PYR-LIKE

PYRI	PYRABACTIN RESISTANCE I
RBOHF	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN F
RISC	RNA- <i>induced silencing complex</i> , complejo de silenciamiento inducido por RNA
RKD	RWP-RK DOMAIN CONTAINING
RNApolIII	RNA polimerasa II
RWC	<i>Relative Water Content</i> , Contenido relativo de Agua.
SAM	<i>Shoot Apical Meristem</i> , meristemo apical del tallo
SE	SERRATE
sncRNAs	<i>small no coding RNAs</i> , RNAs pequeños no codificantes
SnRK2	SNF1 RELATED SERINE/THREONINE KINASES, SNF1 ( <i>sucrose nonfermenting-1 kinase</i> )
SOSI	SALT OVERLY SENSITIVE I
START <i>domain</i>	<i>steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid-transfer</i> , dominio que caracteriza a las proteínas de transferencia de lípidos
TAK1	Takaragaike-1. Línea silvestre de plantas que desarrolla anteridios (“macho”) aisladas originalmente en Kioto Japón. La línea correspondiente a las plantas que generan oogonios (“hembra”) se denomina TAK2
TAS3	trans-acting siRNA3
ta-siRNAs	trans-acting siRNAs

# 1 Introducción

## 1.1 *Marchantia polymorpha*, una briofita

*Marchantia polymorpha* es una hepática (división Marchantiophyta), el grupo más basal del linaje de las plantas terrestres, el clado Embriophyta, que además de las hepáticas, agrupa a musgos (Briophyta), antoceros (Anthocerotophyta) y plantas vasculares (Tracheophyta). Las divisiones Marchantiophyta, Briophyta y Anthocerotophyta se denominan briofitas *sensu lato* y conforman el grupo de las plantas no vasculares (Shimamura, 2016). Estos organismos comparten características que los distinguen del resto de las plantas terrestres, por ejemplo, carecen de tejidos vasculares y de raíces verdaderas. Sin embargo, las briofitas poseen cualidades interesantes desde el punto de vista de la colonización del medio terrestre, por ejemplo: un esporofito multicelular diploide, un meristemo apical en su fases esporofíticas y gametofíticas con una célula apical con la capacidad de producir tejidos tridimensionales y una diferenciación celular que provee adaptaciones morfológicas y fisiológicas al medio terrestre (Bowman *et al.*, 2017; Takezawa *et al.*, 2011). A continuación, se indica la clasificación taxonómica de *M. polymorpha*.

Clasificación (Crandall-Stotler *et al.*, 2009)

**Phylum** Marchantiophyta  
**Clase** Marchantiopsida,  
**Subclase** Marchantiidae,  
**Orden** Marchantiales,  
**Familia** Marchantiaceae,  
**Género** *Marchantia*,  
**Especie** *Marchantia polymorpha*

Las briofitas son el segundo grupo de plantas más extenso (Buck *et al.*, 2008), contando con alrededor de 350,000 especies, número que es superado únicamente por las plantas con flor (Magnoliophyta) (Glime y Bisang, 2013). Se ha estimado que las hepáticas son un grupo con una alta biodiversidad, reflejada en su riqueza de especies: actualmente es aceptado que existen 7,500 especies de hepáticas en el mundo. Von Konrat *et al.* (2010) apoya este dato ajustando esta cifra al considerar problemas que inflan los taxa como la sinonimia (describir a una sola especie bajo dos nombres diferentes), entre otros.

Las briofitas, como todas las plantas terrestres, presentan alternancia de generaciones, es decir, un ciclo de vida en el cual se alterna la generación del gametofito con la generación del esporofito, los cuales son estadios de vida multicelulares vinculados por estadios reproductivos unicelulares denominados gametos y esporas (Graham y Wilcox, 2000). El esporofito es un estadio diploide ( $2n$ ) que produce meiosporas haploides, las cuales se desarrollan como gametofitos haploides ( $n$ ) que producen gametos que se fecundan para dar lugar al esporofito. Los clados que integran a las briofitas comparten la característica de tener un ciclo de vida haplodiplobiótico, denominado así porque domina la fase haploide del ciclo de vida sobre la fase diploide. El gametofito haploide es una estructura independiente, de vida libre y autotrófica, en éste se forman los gametos en estructuras especializadas. Tras la fecundación, se desarrolla el esporofito el cual se encuentra unido al gametofito y es parcialmente dependiente de éste. Este aspecto es único de las briofitas debido a que las plantas vasculares poseen dominancia del esporofito diploide (Buck *et al.*, 2008).

A pesar de su anatomía sencilla, estas plantas colonizan ambientes diversos. Normalmente se encuentran en regiones de climas húmedos o asociados a corrientes de agua, existen incluso especies acuáticas, aunque no hay especies marinas. De manera interesante, algunas briofitas colonizan ambientes de clima muy cálido y otras habitan en condiciones de temperatura baja, por ejemplo, en regiones árticas. Existen incluso algunos musgos (División Bryophyta) que viven en regiones semidesérticas. Las briofitas son además colonizadores primarios, soportando condiciones cambiantes adversas al asociarse a rocas expuestas (Goffinet, 2008; Proctor *et al.*, 2007; Raven *et al.*, 2013). En todas estas condiciones las plantas pueden estar expuestas a ciclos de deshidratación e hidratación debidos a la sequía o al frío.

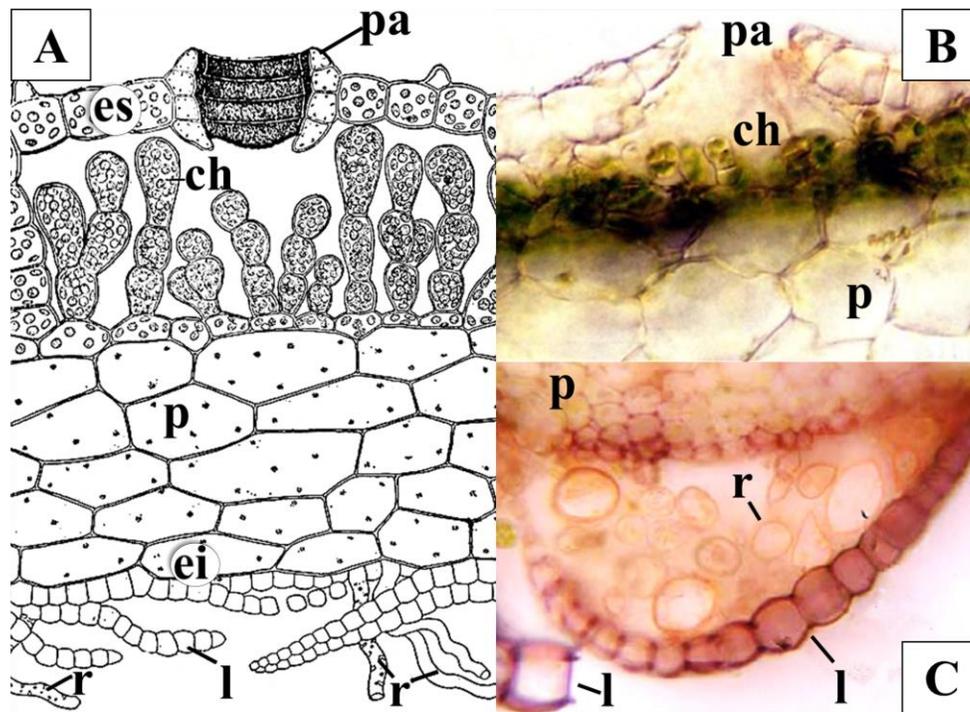
### 1.1.1 Morfología de *M. polymorpha*

Dentro de las hepáticas existen principalmente dos morfologías, una en la que se pueden distinguir estructuras que semejan un tallo y hojas (filidios) y las que tienen una morfología denominada talo. *Marchantia* es un género compuesto por hepáticas talosas (Glime y Bisang, 2013), es decir, los individuos de este grupo están constituidos por estructuras llamadas talos, los cuales constituyen el gametofito haploide. Las hepáticas comparten muchas

características con el resto de las briofitas, pero también poseen características únicas, siendo *M. polymorpha* la “especie tipo del clado” de las hepáticas. Una especie tipo es un término taxonómico que indica que sus características morfológicas son consideradas como base para incluir a otras especies en este grupo.

El talo de *M. polymorpha* tiene una apariencia aplanada con un eje dorsoventral y posee simetría bilateral. La morfología del talo se origina mediante divisiones dicotómicas. En la parte superior se encuentra la epidermis, donde se desarrollan poros aéreos que comunican a las cámaras aéreas, en éstas se alberga al parénquima con actividad fotosintética o clorénquima (Glime y Bisang, 2013). A continuación, presentan una capa de múltiples estratos que forma el parénquima de almacenamiento. Como otras hepáticas, *M. polymorpha* posee vesículas que almacenan aceites (*oil bodies*), los cuales son organelos cubiertos por una membrana sencilla; estos cuerpos son de color gris-café y contienen triacilgliceroles, proteínas y carbohidratos (Glime y Bisang, 2013). Esta es una característica particular de las hepáticas.

La parte inferior del talo se delimita por otra epidermis, donde se presentan escamas y rizoides, estructuras filamentosas unicelulares que permiten el anclaje al sustrato (a diferencia de los musgos, donde comúnmente estas estructuras son multicelulares) (Glime y Bisang, 2013) (Figura 1.1).



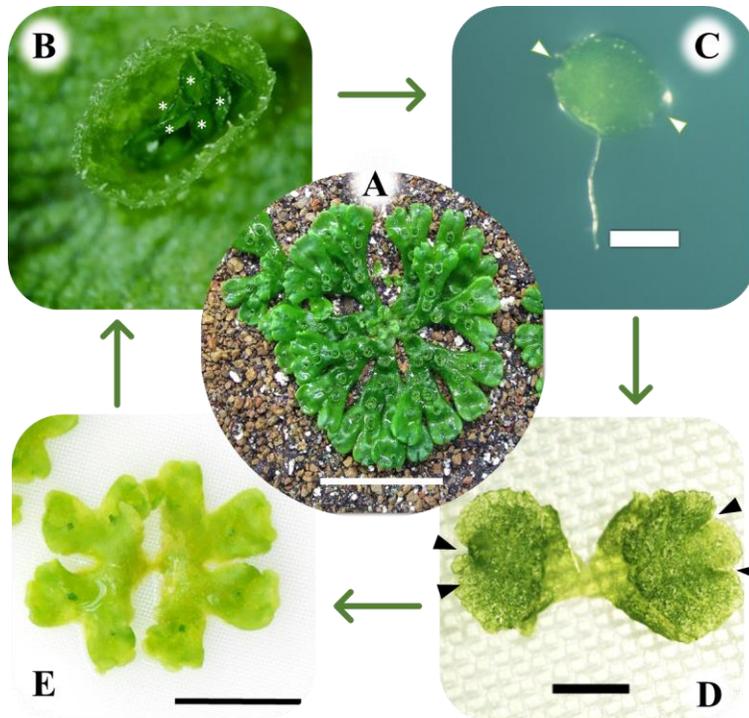
**Figura 1.1** Corte transversal del talo de *M. polymorpha*. En A se ilustra la estructura de un corte transversal donde se observa la epidermis superior (es), que presenta poros aéreos (pa) sobre una cámara aérea donde se encuentra el clorénquima (ch); bajo esta estructura, se encuentra primero el parénquima de almacenamiento (p) y en la parte subyacente, la epidermis inferior (ei), donde se pueden observar algunas escamas (l) y rizoides (r). En B se muestra la micrografía de un corte transversal donde se muestra un poro aéreo, el clorénquima y el parénquima de almacenamiento y en C la micrografía de un corte transversal que muestra el parénquima de almacenamiento, la epidermis inferior con escamas y los rizoides (Tomadas de Glime y Bisang, 2013).

### 1.1.2 Reproducción de *M. polymorpha*

*M. polymorpha* tiene dos mecanismos de reproducción, uno sexual y uno asexual. La reproducción sexual depende de estructuras de reproducción especializadas que se encuentran en individuos distintos, ya que es una planta dioica. Los gametofitos femenino y masculino desarrollan los gametos en estructuras especializadas denominadas gametóforos (anteridióforo y arquegonióforo). El gametofito masculino desarrolla anteridios (gameto masculino) en el anteridióforo y el gametofito femenino forma arquegonios (gameto femenino) en el arquegonióforo. Los gametóforos forman un pedúnculo que sobresale del talo. Los anteridios son liberados del anteridióforo cuando el talo entra en contacto con el

agua, por ejemplo, durante la lluvia. Los anteridios móviles se desplazan por la película de agua en el arquegonióforo para llegar al arquegonio que es inmóvil. La fecundación es seguida por el desarrollo de un esporofito diploide que, a través de meiosis, forma cuatro esporas unicelulares haploides. El desarrollo de la espora regenera el gametofito (Glime y Bisang, 2013). La inducción del estadio de reproducción sexual es influenciada por factores ambientales y se sabe que sólo ocurre en condiciones de día largo (Yamaoka *et al.*, 2004) y que requiere inducción por luz roja y luz roja lejana (Flores-Sandoval *et al.*, 2018).

La reproducción asexual depende de estructuras de propagación llamadas gemas que se forman en estructuras especializadas en forma de copa denominadas conceptáculos (Figura 1.2 B y C). Las gemas son clonas vegetativas del talo parental haploide, desde este estadio se establece el eje dorsoventral de la planta a través del estímulo gravitatorio y luminoso (Bowman, 2016). La dispersión de las gemas en la naturaleza es facilitada por la presencia de agua que las arrastra desde el conceptáculo. Tras ser colocadas en sustrato o medio nutritivo, las gemas se desarrollan en un talo completo. El talo de *M. polymorpha* inicia su fase de crecimiento juvenil a partir de que la gema deja el conceptáculo y hasta los 7 días cuando alcanza su madurez e inicia su fase de crecimiento adulto, caracterizada por la aparición de poros aéreos en la superficie dorsal y por la división de los meristemos apicales (Figura 1.2 C y D) (Solly *et al.*, 2017). Los talos desarrollan conceptáculos en un periodo de 14 a 20 días. Estos procesos se ven afectados por las condiciones ambientales.



**Figura 1.2 Ciclo de reproducción asexual de *M. polymorpha*.** A) se muestra un talo maduro en el que se desarrollan conceptáculos (barra de escala, 5 cm), B) conceptáculo que muestra gemas en desarrollo (asteriscos) (el conceptáculo mide alrededor de 3 mm), C) gema (barra de escala, 0.5 mm), D) talo joven de 7 días de desarrollo (barra de escala 1 mm), E) talo de 20 días de edad donde se observa el inicio del desarrollo de los conceptáculos (barra de escala 1 cm). Las cabezas de flecha indican las zonas meristemáticas (Fotos A y B por Godínez-Vidal, D., C-E por Jenny García).

### 1.1.3 Situación filogenética de *M. polymorpha*

Estudios filogenéticos concuerdan en que las plantas terrestres tuvieron su origen a partir de formas de vida acuáticas. Este origen se remonta a 480–430 millones de años atrás, de hecho la colonización del medio terrestre es uno de los pasos de mayor trascendencia en la evolución de las plantas (Oliver *et al.*, 2005). Varias fueron las adaptaciones implicadas en el paso del agua a la colonización del medio terrestre, entre éstas la protección parental del embrión en desarrollo, la producción de gametos en estructuras especializadas y la alternancia de generaciones (Wickett *et al.*, 2014), entre el gametofito y el esporofito en el ciclo de vida.

Las plantas terrestres forman un grupo monofilético. Se ha discutido cuál es el grupo hermano de las embriofitas y cuál es el grupo más basal de las plantas terrestres. Actualmente es reconocido que el grupo hermano de las plantas terrestres son las charales (un grupo de algas que pertenecen a las Charophyta) y el grupo más basal de plantas terrestres son las hepáticas (Chang y Graham, 2011; Karol, 2001; Qiu, 2008). Por ejemplo, Karol *et al.* (2001), sitúa a las charales como el grupo evolutivamente más cercano a las embriofitas y a *M. polymorpha* como representante de las hepáticas y lo considera el grupo más basal. Su trabajo incluye evidencia anatómica y molecular. Su análisis se llevó a cabo con cuatro genes: *atpB* y *rbcL* (genes plastídicos), *nad5* (mitocondrial) y a un gen del RNA de la subunidad pequeña ribosomal (nuclear). Otros autores (Alaba *et al.*, 2015; Crandall-Stotler *et al.*, 2009) consideran al género *Pellia* como la planta más basal, este género pertenece a la clase jungermanniopsida. Esto revela la controversia en la filogenia de las briofitas.

En general, la mayoría de los trabajos que se han propuesto resolver la filogenia de las plantas terrestres, se ven limitados en cuanto al número de genes que consideran o en cuanto a qué se restringe al análisis de los genomas de cloroplastos y mitocondrias. Recientes trabajos que incluyen más genes y especies en sus análisis cuestionan estos paradigmas. Por su parte, Wickett *et al.* (2014) realizaron un trabajo a gran escala para resolver las preguntas en torno a la relación filogenética de las plantas con las algas y los principales linajes de las embriofitas. En dicho trabajo se analizaron 852 genes nucleares codificantes de proteínas de 103 grupos, obtenidos por el análisis de 92 transcriptomas de estreptofitas (algas y embriofitas), generados de *novo* y 11 genomas nucleares de plantas, albergados en bases de datos públicas. Este trabajo define a las zygnetophyceae (también del linaje de las charophyta), como el grupo hermano de las plantas terrestres. Sin embargo, este análisis no pudo concluir cuál de los grupos dentro de las briofitas es el grupo hermano de las plantas terrestres, pero su análisis sugiere que los antoceros son el grupo menos probable como grupo basal. Se debe considerar que este trabajo tiene un gran impacto debido al número de especies y genes que considera, pero se restringe a la evidencia molecular. Sin embargo, el registro fósil coincide con estas conclusiones. En ese sentido, se han registrado fósiles determinados como hepáticas datados del periodo ordovícico-silúrico, lo que antecede a los registros más tempranos para musgos, que datan del periodo carbonífero, y a los antoceros cuyos registros más tempranos datan a su vez del periodo cretácico (Bowman *et al.*, 2017). En conjunto,

todas estas evidencias (morfológicas, moleculares y paleobiológicas), sugieren a las hepáticas como el grupo más basal de plantas terrestres (Proctor, 2014; Proctor *et al.*, 2007; Wickett *et al.*, 2014).

Aunque la resolución de esta controversia requiere mayor evidencia, existe un fuerte apoyo a que los primeros colonizadores del medio terrestre poseían características muy similares a las briofitas. El hábito de vida terrestre presenta ventajas como mayor concentración de CO<sub>2</sub> en el aire respecto al agua y mayor intensidad de luz, aunque la colonización de este medio requirió la implementación de mecanismos que permitieran a los primeros colonizadores tolerar la variación en la disponibilidad del agua. La tolerancia a la desecación y a la radiación UV son capacidades que las hepáticas comparten con las algas carofitas, por lo que se interpreta que estas capacidades se desarrollaron antes de la colonización del medio terrestre. La formación de esporas tolerantes a la desecación es una característica requerida en los primeros colonizadores de las plantas terrestres y la maquinaria de genes necesarios para éstas y otras capacidades metabólicas se encuentran presentes en *M. polymorpha* (Bowman *et al.*, 2017).

Se considera que el linaje al que pertenece *M. polymorpha* es descendiente de los primeros colonizadores del medio terrestre (Bowman *et al.*, 2007; Ishizaki *et al.*, 2008; Oliver *et al.*, 2005; Proctor *et al.*, 2007). El ancestro directo de las que observamos hoy en día tendría características como: alternancia de generaciones, un gametofito haploide dominante, un esporofito dependiente y reducido (a un grupo de células), ausencia de sistema vascular y la presencia de esporopolenina (un politerpeno de la pared de las esporas y la cubierta del grano de polen) (Ligrone *et al.*, 2012), entre otras propiedades. Estas características están representadas en las briofitas.

Aunque el estudio de varios tipos de estrés como el calor, (Marchetti *et al.*, 2021), el frío (Ogasawara *et al.*, 2013) o el estrés oxidativo (Spinedi *et al.*, 2021), han resultado de interés en este modelo, la falta de agua es el primer efecto implicado en el cambio del hábito de vida acuático al terrestre. Por esto, el estudio de la respuesta a estrés hídrico de *M. polymorpha* es relevante para entender qué factores basales son importantes para contender con el estrés en las plantas terrestres y extrapolarlo a cómo los primeros colonizadores del medio terrestre contendieron con la limitación de agua. La falta de agua en el medio genera

déficit hídrico en las plantas, y por otro lado, causa el aumento de la concentración de solutos en el sustrato, generando la salinización del medio. Por esto, en el grupo, Godínez-Vidal continuó con el estudio de la falta de agua en el medio (entre otras condiciones), y este trabajo se enfocó en el estudio del estrés hídrico generado por exposición a salinidad, aprovechando que es una condición fácilmente controlable y reproducible en el medio de crecimiento.

## **1.2 La salinidad genera déficit hídrico en las plantas**

El déficit hídrico es una condición en la que la tasa de evaporación de la hoja excede la tasa de toma de agua a través de la raíz (Bray *et al.*, 1997); esta definición es más adecuada para plantas vasculares ya que se trata de organismos que pueden mantener la homeostasis de su contenido de agua. Las briofitas son definidas como organismos poiquilohídricos, es decir, su hidratación varía con la disponibilidad de agua en el ambiente de forma más directa (Raven *et al.*, 2013). En estas, existe un intercambio gaseoso a través de poros lo que genera un gradiente a través del talo, que va del punto de contacto con el sustrato hacia la epidermis superior y luego hacia el aire. El punto de anclaje del talo son los rizoides a los que se les atribuye la propiedad de ser de adhesión al medio y no de transporte de agua como la raíz, sin embargo, son el punto de interacción con el sustrato donde inicia el gradiente hídrico. Bajo estas consideraciones, tanto para plantas vasculares como no vasculares, la restricción en la disponibilidad del agua en el medio genera déficit hídrico.

En plantas no vasculares podría considerarse que el déficit hídrico ocurre cuando el agua en el medio (aire o sustrato) disminuye y, por lo tanto, el talo comienza a perder el agua necesaria para realizar las funciones biológicas adecuadamente. La escala de estas plantas hace necesario considerar diferencias en la adquisición del agua en el medio. En las plantas vasculares la gravedad constituye una fuerza importante en el transporte del agua a través de la planta, especialmente en árboles. Sin embargo, para las briofitas, la tensión superficial está dentro de las fuerzas más poderosas y la gravedad es relativamente trivial (Proctor *et al.*, 2007). En todos los casos, el movimiento del agua se da por gradientes de energía libre, desplazándose de sitio de mayor energía libre al de menor energía libre. La magnitud más empleada para expresar la energía libre es el potencial hídrico ( $\Psi_h$ ). El agua pura tiene mayor estado de energía libre, la presencia de solutos, la interacción del agua con el sustrato y la

gravidad son algunos factores que cambian el potencial hídrico del agua (Arroyo, 2012; Bray *et al.*, 1997). En este sentido, el potencial hídrico es una manera directa de expresar el estatus hídrico de la planta, aunque no es la única. Otra manera de expresarlo es el contenido relativo de agua (RWC por sus siglas en inglés), que representa el contenido porcentual de agua en la planta en un momento dado, respecto a su contenido de agua en un estado de turgencia máxima.

Diversos fenómenos pueden afectar el estatus hídrico vegetal, al disminuir la disponibilidad de agua en el medio, o anulando el gradiente hídrico, lo que causará déficit hídrico vegetal. Condiciones como las bajas temperaturas, la sequía, las altas temperaturas y la salinización del suelo, comparten la característica de retener o restringir la disponibilidad del agua en el sustrato e impedir su transporte hacia los tejidos vegetales. Las bajas temperaturas provocan la congelación del agua lo que impide su transporte. La sequía se define como la reducción en la precipitación por un periodo de tiempo, en este fenómeno climático convergen altas temperaturas, escasez de agua, y al reducirse la presencia del agua, aumenta la concentración de los solutos en el sustrato, generando la salinización de los suelos. (Redondo-Gómez, 2013). Estos fenómenos pueden presentarse en la naturaleza de manera combinada e interdependiente, por ejemplo, un largo periodo de sequía puede llevar a la salinidad del suelo, así como una época de calor puede llevar a la sequía y en consecuencia a la salinidad del suelo.

La salinidad afecta el desarrollo óptimo de las plantas generando defectos morfológicos fisiológicos bioquímicos y moleculares que alteran el crecimiento y la reproducción. Se pueden distinguir dos componentes del estrés salino, el estrés osmótico y el iónico. A su vez, la escasez de agua en el medio provocada por diversas condiciones genera dos efectos, la limitación de agua en el sustrato y el aumento en la concentración iónica. De esta manera, el estrés osmótico y el iónico son eventos interrelacionados (Upadhyaya *et al.*, 2013).

El efecto osmótico de la salinidad impide el transporte adecuado del agua del medio hacia la planta, lo cual produce una disminución en el potencial hídrico de las células vegetales. Por su parte el efecto iónico afecta el transporte y el balance de iones en las células y tejidos vegetales. En condiciones normales las plantas mantienen una baja concentración

intracelular del ion  $\text{Na}^+$  (Redondo-Gómez, 2013), pero este gradiente se puede perder cuando el medio posee altas concentraciones de este ion lo cual es particular en las hepáticas, plantas de anatomía sencilla cuyos rizoides son unicelulares.

### **1.3 Las plantas responden al estrés**

Los ajustes que las plantas llevan a cabo para contender con el estrés alteran su desarrollo, sus procesos metabólicos, su fisiología y su expresión génica. Estas respuestas son exitosas en la medida en que el organismo pueda sobrevivir y mantener su capacidad de reproducirse a pesar de las condiciones adversas (Redondo-Gómez, 2013).

#### 1.3.1 Respuestas morfológicas, fisiológicas y moleculares

Las respuestas a estrés que las plantas manifiestan pueden ser particulares para un determinado tipo de estrés o pueden ser compartidas por diferentes tipos. Por ejemplo, el estrés oxidativo y el estrés iónico están presentes durante condiciones ambientales como bajas temperaturas, sequía y salinidad. Los fenómenos que ocurren durante el estrés son diversos y el único factor común descrito hasta ahora, es la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Madhava Rao *et al.*, 2006).

De acuerdo con Madhava Rao, *et al.* (2006), las respuestas a estrés pueden clasificarse en tres grupos: respuestas morfológicas (relacionadas con el crecimiento, la senescencia y la productividad), respuestas fisiológicas (relacionadas con la tasa de respiración, fotosíntesis, asimilación de nitrógeno y absorción de agua) y respuestas moleculares (relacionadas principalmente con la expresión génica, la síntesis de proteínas y la organización de las membranas), pero no se pueden desligar entre ellas ya que se encuentran relacionadas. La respuesta a estrés conlleva tres pasos 1) la reducción de la pérdida de agua (que ocurre de manera poco significativa en las briofitas hasta donde se ha estudiado), 2) la protección de la maquinaria fotosintética y 3) la acumulación de osmolitos.

A nivel fisiológico, las células vegetales acumulan osmolitos, los cuales son moléculas orgánicas que aumentan el potencial osmótico intracelular para retener el agua. Tales moléculas pueden ser aminoácidos como la prolina (Pro) y la glicinbetaina (GB),

poliaminas, azúcares como fructuosa y sacarosa, ácidos orgánicos como el malato y el oxalato, entre otros (Redondo-Gómez, 2013). Estos solutos no afectan el metabolismo celular, pero cumplen con la función de retener agua favoreciendo el aumento del potencial osmótico.

También se ha descrito que los osmolitos protegen a la célula de la acumulación de ERO. Por ejemplo, se ha descrito que la Pro se acumula en el citoplasma y la vacuola, protegiendo a la planta de  $O_2$  y  $HO^-$  directamente. Además, se ha descrito que durante la síntesis de Pro se usa el NADPH para la reducción del glutamato, lo que incrementa la disponibilidad del  $NADP^+$  que es necesario para contender con la sobre-reducción del fotosistema uno (PSI) durante el estrés y equilibrar la balanza entre el  $NADP^+/NADPH$ . La Pro y la GB también protegen al fotosistema II (PSII) de manera indirecta (Upadhyaya *et al.*, 2013).

Las estrategias para contender con el estrés iónico implican por un lado la exclusión del ion sodio ( $Na^+$ ) de la célula a través de canales iónicos evitando su entrada, y por el otro, la acumulación del  $Na^+$  en la vacuola con el fin de inclinar la balanza del gradiente osmótico. Estas respuestas fisiológicas y metabólicas del efecto iónico y osmótico ante la salinidad son acompañadas por la regulación génica y la señalización hormonal. Respuestas que han sido estudiadas en plantas vasculares sobre todo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y en cultivos de interés económico donde se ha demostrando la expresión diferencial de algunos genes como *SOS1* (*Salt Overly Sensitive*, alta sensibilidad a la sal), que codifica para una proteína de cotransporte antiparalelo  $Na^+/H^+$  (Upadhyaya *et al.*, 2013). Sin embargo, la respuesta a estrés en briofitas se ha estudiado poco a nivel molecular, aunque se espera un cambio en los patrones de expresión de los genes involucrados en la respuesta a estrés como en otros organismos y la participación de mecanismos moleculares conservados.

Otro factor descrito en la respuesta a estrés es la acumulación de un tipo de proteínas muy hidrofílico denominado LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA), las cuales se acumulan en niveles altos durante el último paso de la maduración de la semilla lo que permite al embrión latente tolerar el estado de desecación de la semilla que lo porta. En el tejido vegetativo de las plantas se acumula en respuesta al déficit hídrico (Battaglia *et al.*, 2008). Las LEAs se caracterizan por pertenecer a un grupo denominado proteínas

intrínsecamente desordenadas, las cuales poseen una alta flexibilidad estructural con lo que son capaces de adquirir un rango de estados conformacionales funcionales, como una consecuencia de su composición de aminoácidos que es rica en residuos de aminoácido cargados e hidrofílicos. Las proteínas LEA se consideran un subgrupo de las hidrofílicas caracterizadas por poseer un alto contenido de glicina (>6%), un alto índice de hidrofílicidad (>1) además del desorden estructural descrito. Diversos estudios han demostrado que participan en la respuesta vegetal al déficit hídrico, estrés iónico y estrés osmótico entre otros y que además muchas proteínas LEA se regulan a través de la respuesta a estrés mediada por ABA. Diversos ensayos han demostrado *in vitro* que las proteínas LEA protegen a otras proteínas evitando su inactivación o agregación inducida por los tratamientos de estrés e incluso en algunos casos, favoreciendo la recuperación de la conformación de las proteínas desnaturalizadas por el tratamiento de estrés, aunque aún falta estudiar estos mecanismos propuestos en sistemas *in vivo* (Covarrubias *et al.*, 2020). No obstante, el documentado aumento en la acumulación de las proteínas LEA en respuesta a diversos tipos de estrés, permiten considerarlas un marcador molecular de estrés en plantas.

### 1.3.2 Respuesta al estrés hídrico en briofitas

La disminución en la disponibilidad de agua en el medio tiene diferentes efectos entre briofitas y plantas vasculares. Dentro de las plantas terrestres prevalecen dos mecanismos adaptativos en relación con el agua. Por un lado, se encuentra la estrategia homohídrica o de evasión de la deshidratación, que consiste en el establecimiento de un sistema de transporte interno de agua y el mantenimiento de un potencial hídrico interno alto a través de mecanismos que evitan la deshidratación del tejido, pese a los niveles externos de disponibilidad de agua; esto describe el mecanismo de las plantas vasculares. Por otro lado, se encuentra la estrategia poiquilohídrica, o de tolerancia a la deshidratación, que consiste en el equilibrio rápido de los tejidos vegetales con su entorno, en consecuencia, el metabolismo tiene la capacidad de detenerse durante un estadio de escasez de agua y reanudarse tras la rehidratación. La tolerancia a la deshidratación implica la sobrevivencia de las plantas tras alcanzar porcentajes de RWC muy pequeños o valores de potencial hídrico muy bajos (<-

100 MPa). Este último mecanismo es prevalente entre las plantas no vasculares y plantas de resurrección (Alpert, 2000; Proctor *et al.*, 2007).

Proctor *et al.* (2007) propusieron que el mecanismo poiquilohídrico, es el estado basal, debido a que, durante el proceso de colonización del medio terrestre, las plantas tuvieron que estar sometidas a condiciones cambiantes y resistirlas, y en un segundo paso evolutivo, se desarrollaron mecanismos de evasión. Esta idea se apoya en varios aspectos: en primer lugar, la tolerancia a la deshidratación se encuentra en mayor proporción en especies de plantas no vasculares respecto a las plantas vasculares. Segundo, los genes relacionados con la tolerancia a la deshidratación se encuentran en casi todas las plantas. Tercero, en plantas vasculares la tolerancia a la deshidratación se encuentra retenida en estructuras especializadas como las esporas, el polen o la semilla y en el estado vegetativo de algunas especies (Donald F. Gaff y Oliver, 2013; Proctor *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que existen tres estrategias principales para contender con la deshidratación a través de la tolerancia: 1) reducir al mínimo el daño causado por la deshidratación así como por la rehidratación, 2) mantener la integridad celular en el estado disecado y 3) activar mecanismos de reparación tras la rehidratación (Oliver *et al.*, 2005). El mecanismo común entre las briofitas es el de poseer características de tolerancia aún antes de que el estrés hídrico se presente. (Oliver *et al.*, 2005; Proctor *et al.*, 2007). Aunque estos mecanismos se analizaron en el contexto de briofitas tolerantes, este grupo presenta un tipo de estrategia distinto al de las plantas vasculares y que puede estar presente en menor medida en otras briofitas, como *M. polymorpha*.

De forma interesante, la mayoría de las briofitas puede sobrevivir en niveles moderados de deshidratación por periodos cortos, y el nivel de deshidratación que toleran está más allá del que ocurre entre las plantas de interés agronómico e incluso las cactáceas (Proctor *et al.*, 2007). Dentro de las plantas vasculares, el tejido vegetativo se mantiene en crecimiento activo con un RWC de ~85 a 100%, los cultivos comunes no sobreviven tras alcanzar un RWC de 50 al 30%. Por otro lado, solamente las plantas vasculares tolerantes a la deshidratación (solo 0.15% de las plantas vasculares) pueden sobrevivir con solo ~5 a 13% de RWC, tras equilibrar su contenido de agua con el del aire. (Donald F. Gaff y Oliver, 2013; Proctor *et al.*, 2007). Por otro lado, en las briofitas la tolerancia a la deshidratación es común,

aunque no universal (más del 10% de los musgos) (Alpert, 2000). En las briofitas se ha registrado la sobrevivencia de musgos y hepáticas tras equilibrar su estatus hídrico con aire seco lo que equivale a un RWC <5% (Donald F. Gaff y Oliver, 2013). Incluso si pensamos en las cactáceas (Cactaceae), solo un género dentro de esta familia posee al menos una especie con tolerancia a la deshidratación ya que la estrategia adaptativa de este grupo consiste justamente en evitar la pérdida de agua en sus tejidos resistiendo a ambientes secos (5% de humedad relativa) pero con todos sus mecanismos enfocados en evitar la pérdida de agua.

Partiendo de esta premisa, Tanaka *et al.* (2018), estudió la regulación de la expresión génica en respuesta a estrés salino en *M. polymorpha*. En este estudio se expusieron gemas a medio de cultivo con una concentración de 0, 50 o 250 mM de cloruro de sodio (NaCl), durante dos semanas. El medio con NaCl 50 mM inhibió el crecimiento de las gemas evaluado a través de su peso seco, donde reflejó un decremento de un tercio respecto a los talos control. Por otro lado, las gemas expuestas al medio con NaCl 250 mM no se desarrollan. A través de análisis de secuenciación masiva de RNA y RTqPCR, se identificaron y confirmaron tres factores de transcripción (FTs) que se expresan diferencialmente en talos crecidos en NaCl 50 mM: ABA INSENSITIVE 5B (MpABI5B), ABA INSENSITIVE 3A (MpABI3A), R2R3 family MYB DOMAIN PROTEIN 17 (MpR2R3-MYB17), los cuales han sido previamente reportados en plantas vasculares como involucrados en la respuesta a estrés salino. Esto que habla de una conservación a nivel molecular en los mecanismos de respuesta a estrés que posee esta briofita (Tanaka *et al.*, 2018).

Sin embargo, aún es necesario llevar a cabo otras aproximaciones para entender los mecanismos de respuesta a estrés en plantas con estrategias de vida distintas a las que hemos estudiado a través de plantas como modelos vasculares. Es interesante que entre los FTs identificados por Tanaka *et al.* (2018) se encuentren factores de respuesta al ácido abscísico (ABA) lo que corrobora la relevancia de esta vía de regulación y respuesta en el linaje de las plantas terrestres.

### 1.3.3 ABA, integrador de la respuesta al estrés

Uno de los factores integradores de las respuestas ante estrés en plantas es el fitoregulador ABA. En plantas vasculares, el ABA regula la dormancia y la aclimatación al estrés hídrico. Esta molécula, entre otras fitohormonas, se encuentra presente en todas las plantas terrestres, tanto en plantas vasculares como no vasculares. Akter *et al.* (2014) reporta que *M. polymorpha* modula su fisiología en respuesta al ABA y que estos ajustes podrían estar asociados con una tendencia a aumentar la sobrevivencia de gemas después de ser sometidas a deshidratación o salinidad. Pence *et al.* (2005) reportó que el pretratamiento con ABA de tres especies de briofitas (*Riccia fluitans*, *Pallavicinia lyellii* y *M. polymorpha*), disminuyó la tasa de pérdida de agua tras someterlas a deshidratación rápida, sugiriendo fuertemente que el papel del ABA durante el estrés se encuentra conservado en plantas terrestres.

La información de la participación del ABA se ha obtenido a partir del estudio de plantas vasculares y sólo recientemente se ha comenzado a estudiar su efecto en briofitas (Takezawa *et al.*, 2011). ABA es un triterpeno cuya síntesis es a partir de intermediarios isoprenoides, comienza en plástidos y finaliza en el citoplasma celular. En plástidos, se parte de betacaroteno, el cual tras varios pasos metabólicos origina a la xantoxinina que es el precursor citoplásmico del ABA y tiene actividad biológica similar al mismo. El precursor inmediato del ABA es el ABA aldehído y es una forma inactiva. Los niveles de la forma activa de esta fitohormona se regulan a través del balance entre su biosíntesis y catabolismo. El catabolismo del ABA y la conjugación de esta hormona con azúcares, son mecanismos que permiten remover el ABA de la células y acotar la señalización que media (Cheng *et al.*, 2014)

El efecto de esta fitohormona es diverso. Participa en procesos como el desarrollo y afecta la dormancia de los primordios y semillas, evita la germinación y acelera la senescencia de las hojas (Raghavendra *et al.*, 2010). Su papel más importante en el contexto del presente trabajo es su participación durante la respuesta a estrés hídrico. Uno de sus roles mejor descritos en plantas vasculares es su participación en el cierre estomático el cual depende de canales de K<sup>+</sup> en las células guarda de los estomas. Los efectos del ABA son mediados por su facultad de inducir cambios en la expresión génica durante los procesos en los que participa mediante su vía de señalización. Como ocurre con otras fitohormonas, la

señalización involucra tres pasos, la fase de percepción de la señal, la transducción de la señal y finalmente, la respuesta a la señal (Light, 2013). La primera fase, donde el ABA inicia la señalización, es mediada por su receptor. Ha sido difícil el hallazgo y caracterización de los receptores de ABA debido a su redundancia funcional y diversidad (Klingler *et al.*, 2010), pero cabe resaltar cuatro sistemas dependientes de diferentes receptores ubicados en distintos sitios celulares:

(1) Los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G (*GPCRs, por sus siglas en inglés*) que funcionan a través de proteínas G asociadas (*G-protein*): GRC2 (Wang y Zhang, 2007) GTG1 y GTG2 (Pandey *et al.*, 2009). Un ejemplo del funcionamiento de este sistema es el cierre estomático al afectar río abajo los canales iónicos que inciden en la turgencia de las células guarda.

(2) La subunidad H de la quelatasa magnesio-protoporfirina IX (CHLH), este receptor de ABA es una de las tres subunidades que componen la Mg-quelatasa. Estas enzimas localizadas en plástidos, catalizan el primer paso de la síntesis de la clorofila. La CHLH coordina la señalización entre el núcleo y el plástido durante condiciones de estrés donde los plástidos dañados envían señales al núcleo para controlar la expresión nuclear de genes que codifican proteínas del plástido (Wang y Zhang, 2007).

(3) El receptor nuclear FCA (FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN A) es un receptor de ABA que controla la floración. La unión de FCA a la proteína FY (FLOWERING LOCUS Y) afecta negativamente la expresión del FT FLC (FLOWERING LOCUS C) el inhibidor central de la floración. La unión entre FCA y FY es inhibida por la unión del ABA a FCA (Wang y Zhang, 2007).

(4) Los receptores citoplásmicos de la familia de dominio START, (*steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid-transfer*, dominio que caracteriza a las proteínas de transferencia de lípidos) considerados los principales receptores del ABA, participan en diversas funciones, entre ellas la respuesta a estrés abiótico (Lee y Luan, 2012; Light, 2013). Los receptores solubles del ABA tipo START, son el receptor PYRABACTIN RESISTANCE I (PYRI) y sus homólogos, las proteínas PYR-LIKE (PYL). Cuando el ABA se une a estos receptores PYR/PYL, promueven su acción inhibitoria sobre ABA INSENSITIVE 1 y 2 (ABI1 y ABI2), un grupo de proteínas fosfatasa tipo 2C (PP2C). El

blanco de las PP2C son las SnRK2, serina/treonina cinasas tipo 2 específicas de plantas a las que inhibe. Las SnRKs son reguladores positivos de la respuesta a ABA. Las SnRK2 fosforilan a sus proteínas blanco, entre las cuales se encuentran canales iónicos como el canal de potasio KAT1, la proteína RBOHF y una NADPH oxidasa las cuales participan en la regulación del balance redox celular y FTs tipo ABF (ABRE BINDING FACTORS) (Light, 2013) Los genes de respuesta al ABA participan en diferentes procesos, entre ellos, crecimiento y división celular, energía y metabolismo, síntesis de proteínas, comunicación celular, respuesta de rescate y de defensa entre otros (Hoth, 2002); se sabe que cerca de un 10% de los genes de *A. thaliana* responden al ABA (Tian *et al.*, 2015).

Bowman *et al.* (2017) identificaron mediante secuenciación masiva y análisis bioinformático, que en *M. polymorpha* existen ortólogos únicos de algunas proteínas involucradas en la señalización por ABA, entre éstos ABA-PYL, SnRK2 y PP2C. Además, se determinó que el receptor MpPYL1 es funcional ya que complementa a la línea mutante *pyr1pyl1pyl2pyl4* de *A. thaliana*. En general, el genoma de *M. polymorpha* contiene un porcentaje menor de genes parálogos en su genoma con respecto a otras plantas terrestres. Sin embargo, los genes que codifican para PYL poseen una alta diversidad de parálogos en el genoma de *M. polymorpha*, a diferencia de otras plantas terrestres. MpPYL posee parálogos con patrones de expresión específicos en el esporofito, sugiriendo una especialización. Además, el factor de transcripción ABI3 se encuentra en *M. polymorpha* y se sabe que juega un rol crucial en la tolerancia a la desecación en briofitas (Khandelwal *et al.*, 2010).

En general, la regulación de las respuestas a estrés tiene lugar a diferentes niveles, la regulación de la transcripción es únicamente el primer paso que afecta la expresión de una función génica. Uno de los niveles de regulación que ha cobrado mayor interés en los últimos años es la regulación postranscripcional mediada por RNAs no codificantes debido a que hace sólo algunos años se consideraba que las secuencias que no codifican para proteínas no tenían ninguna función dentro de las células. De esta forma, el develamiento de la función de estos genes rompe el paradigma que estableció el dogma central de la biología molecular, que proponía un flujo lineal de la información génica, del gen al mensajero y finalmente a la proteína, que llevaba a cabo la función de un gen. La participación de estas moléculas en *M. polymorpha* es un tópico aún poco explorado.

## 1.4 Los miRNAs participan en la respuesta a estrés

### 1.4.1 Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs son uno de los principales grupos de RNAs pequeños no codificantes. Son moléculas de RNA de 21-24 nucleótidos codificados en genes *MIR* y en plantas tienen, en general, su propia unidad transcripcional con sus regiones regulatorias y promotora correspondientes. Los genes *MIR* son transcritos por la RNA polimerasa II (RNAPolII), que sintetiza un transcrito denominado primario (pri-miRNA) (Axtell et al., 2011). El pri-miRNA varía de longitud, se ha identificado que tienen una longitud de 1,277 bases en promedio con un rango que va de 206 pb hasta 6,026 pb (Lauressergues et al., 2022) Como otros mensajeros es modificado durante la transcripción con la adición del “cap” (5’ 7-metilguanosa). Tras su transcripción es reconocido por el complejo de unión al “cap” nuclear donde participan los complejos : CBP20 y CBP80 (Sosa-Valencia et al., 2013). La mayoría de los pri-miRNAs en plantas originan un solo dúplex miRNA/miRNA\* (Axtell et al., 2011).

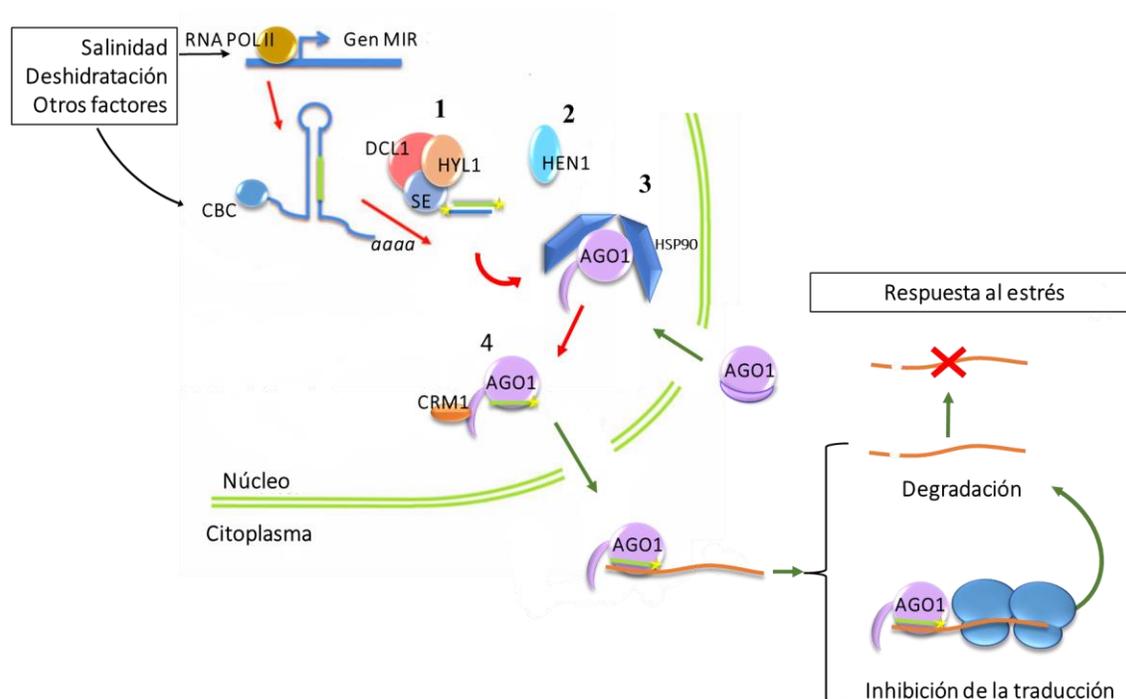
Los pri-miRNAs son procesados en regiones nucleares denominadas cuerpos D (de *dicing bodies*). La enzima DICER-LIKE 1 (DCL1), la proteína de unión a RNA de doble cadena HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y la proteína con dedos de zinc SERRATE (SE), son factores necesarios para la maduración del dúplex miRNA/miRNA\*. DCL1 es una ribonucleasa que pertenece al grupo III de RNAsas que corta al pri-miRNA, empezando usualmente a partir de la base del tallo-asa originando un miRNA precursor (pre-miRNA) y posteriormente, procesa el asa del pre-miRNA generando un dúplex miRNA/miRNA pasajero (miRNA/miRNA\*) (Yu et al., 2017). HYL1 interactúa con DCL1, eficientizando el corte preciso que ejecuta DCL1 sobre el precursor y también se sabe que incide sobre la maduración del mRNA de algunos miRNAs primarios y se ha propuesto que afecta la selección de la cadena que se cargará en ARGONAUTA 1 (AGO1), a partir del dúplex miRNA/miRNA\*. Por otro lado, SE participa en el procesamiento de los pri-miRNAs y es necesaria para la acumulación de los miRNA maduros; además de participar durante la biogénesis de los miRNAs también participa en la maduración de mRNAs en general (Yu et al., 2017). Estos tres componentes de la biogénesis, están a su vez regulados por otros cofactores, por ejemplo la proteína de unión a RNA DAWDLE (DDL) que interactúa con DCL1 y estabiliza los pri-miRNAs (Ha y Kim, 2014), C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE (CPL) y SnRK2 que afectan la actividad y estabilidad de HYL1 a

través de su fosforilación (Yu Yu *et al.*, 2017). Tras este procesamiento, el dúplex miRNA/miRNA\* sufre una 2'-O-metilación en el extremo 3' por el HUA ENHANCER 1 (HEN1), esta modificación evita la degradación de los miRNAs, aunque no se ha confirmado si HEN1 y DCL1 interactúan directamente (Yu Yu *et al.*, 2017).

AGO1, que es el núcleo del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), se localiza principalmente en el citoplasma, donde ejecuta el corte o inhibición de la traducción de los transcritos blanco a los que es guiada a través del miRNA. Es por esto por lo que entra de manera transitoria al núcleo, donde es cargada con el miRNA maduro para poder ser guiada a sus transcritos blanco. La localización de AGO está controlada por señales ubicadas en su región N-terminal. Al entrar al núcleo, AGO1 interactúa con la HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) lo que permite un cambio conformacional necesario para la incorporación del dúplex miRNA/miRNA\*, la disociación de la HSP90 genera la remoción de la cadena pasajera, obteniendo un complejo RISC maduro (Bologna *et al.*, 2018). Finalmente, el cambio conformacional en AGO1 inducido por la incorporación del miRNA, permite que ésta sea reconocida por la exportina CRM1, la cual es necesaria para que la AGO1 cargada sea exportada al citoplasma (Bologna *et al.*, 2018). En el citoplasma, los miRNAs guían a RISC a sus transcritos blanco por complementariedad de bases, para dirigir su degradación o inhibir su traducción (Figura 1.3). Las AGO1 no cargadas exponen residuos que les permiten ser importadas al núcleo donde son sustrato para cargar a sus miRNAs guías (Bologna *et al.*, 2018; Yu Yu *et al.*, 2017).

Diversos factores medioambientales afectan la acumulación de los miRNAs, en general y se han documentado en la literatura numerosos ejemplos específicos de cómo condiciones como la salinidad y la deshidratación repercuten en la acumulación de algunos miRNAs lo que afecta la tolerancia al estrés (Sunkar *et al.*, 2012). Además y de forma interesante, algunas mutantes de la planta modelo *A. thaliana*, comprometidas en la biogénesis de miRNAs (por ejemplo HYL1) son sensibles al ABA, lo que vincula el papel de los miRNAs con esta hormona integradora de la respuesta a estrés (Covarrubias y Reyes, 2009 y Sunkar *et al.*, 2012).

La figura 1.3 ilustra los pasos esenciales durante la biogénesis de los miRNAs y los modos de acción sobre sus mRNAs blanco en el contexto de la respuesta a los factores de estrés.



**Figura 1.3 Biogénesis de los miRNAs y efecto sobre sus mRNAs blanco.** Los miRNAs son transcritos por la RNAPolIII en respuesta a factores como la salinidad y deshidratación, entre otros. DCL1, HYL1 y SE participan en la maduración del miRNA dúplex (1), el cual es metilado por HEN1 (2). AGO1 (enzima núcleo del RISC) es transportada al núcleo donde incorpora el miRNA maduro con ayuda de HSP90 (3), este complejo es exportado al citoplasma gracias a CRM1 (4). Los miRNAs guían al RISC para efectuar la degradación o inhibición de la traducción de sus mRNAs blanco como parte de los mecanismos de respuesta al medio ambiente. Modificado de Covarrubias y Reyes (2009), (Bologna *et al.*, 2018).

En *M. polymorpha*, varios autores (Pin-Chun Lin *et al.*, 2016; Shih-Shun Lin y Bowman, 2018; Tsuzuki *et al.*, 2016) han demostrado que la vía de regulación postranscripcional mediada por miRNAs, no sólo posee los genes requeridos para su biogénesis y actividad, sino que es funcional. Esto debido a que se han encontrado los genes ortólogos de los componentes principales de la vía, por ejemplo, AGO1 y DCL1, presencia de miRNAs, pre-miRNAs e intermediarios de la degradación de los mRNAs blanco de

miRNAs como fragmentos 3' producto de la degradación de los mRNAs cortados por AGO1 que poseen un extremo 5'P y un extremo 3' poliadenilado, lo que los distingue de otras poblaciones de RNA.

#### 1.4.2 miRNAs y estrés

En plantas los principales blancos de miRNAs son factores transcripcionales (FTs), por lo que su actividad tiene un gran impacto en la reprogramación de la expresión génica (Sunkar *et al.*, 2012). *M. polymorpha* no es la excepción ya que Lin *et al.* (2016a) identificaron que 26.4% de los blancos de miRNAs corresponden a FTs.

Esto es interesante ya que varias familias de FTs responden a estrés (Singh, 2002). Por ejemplo en *A. thaliana*, miR169 regula al mRNA que codifica para la subunidad A del factor de transcripción nuclear NFY (NFYA) (Li *et al.*, 2008). Este FT es necesario para la expresión de varios genes de respuesta a estrés, y su sobreexpresión aumenta la resistencia al estrés hídrico. Durante estrés hídrico, miR169 disminuye su acumulación permitiendo la acumulación del mRNA de este FT (Li *et al.*, 2008). Además, la respuesta de miR169 durante estrés, depende de ABA (Li *et al.*, 2008).

Otro ejemplo es miR159, un miRNA conservado en plantas terrestres que regula FTs tipo MYB (Reyes y Chua, 2007). En plántulas de *A. thaliana*, este módulo regula el desarrollo, participa durante la respuesta a estrés y responde a la fitohormona ABA. miR159 regula negativamente los transcritos de MYB33 y MYB101 los cuales son a su vez, reguladores positivos de la respuesta a ABA, ya que su ausencia genera hiposensibilidad a esta fitohormona. Además, miR159 se acumula en respuesta a ABA y a sequía durante la germinación. Dado que ABA induce la acumulación MYB33 y MYB101 y, a su vez, induce la acumulación del regulador negativo de estos FTs, este sistema pudiera parecer contraintuitivo. No obstante, es un interesante caso que muestra que la regulación mediada por miRNAs implican un sistema de regulación fina que en este caso sugiere un mecanismo homeostático que dirige la acumulación y degradación de los FTs tipo MYB, coordinada por la misma señal (el ABA), para desensibilizar la señalización hormonal durante la respuesta a estrés.

Los blancos de miRNAs que codifican proteínas que no son FTs, también juegan un rol en la respuesta a estrés hídrico, aunque son menos comunes. Por ejemplo, miR398 y miR2119, un par de miRNAs codificados por el mismo gen en las leguminosas, regulan al mRNA de la superóxido dismutasa cobre-zinc 1 (CSD1) y al de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), respectivamente (De la Rosa *et al.*, 2019). La acumulación de miR398 disminuye durante déficit hídrico, permitiendo acumularse al mRNA de la CSD1 que contiene con las ERO presentes durante estrés. La deshidratación también promueve la acumulación de ADH1 que contribuye a la regeneración del poder reductor de NAD<sup>+</sup> (De la Rosa *et al.*, 2019).

Además de la acumulación diferencial de los miRNAs durante diferentes condiciones de estrés, Capitão *et al.* (2011) encontraron que la acumulación de DCL1 y AGO1 se incrementa al exponer a la leguminosa *Medicago truncatula* a condiciones de déficit hídrico, lo que puede implicar una regulación global de esta vía.

Xia *et al.* (2016), caracterizaron especies pequeñas de RNAs no codificantes (sncRNAs) en el musgo modelo *Physcomitrella patens*, en una línea mutante nula de ABI3, mediante secuenciación masiva de RNA, tanto en condiciones de deshidratación y rehidratación, así como durante tratamiento con ABA. Este estudio reportó 22 miRNAs nuevos y 6 loci en el genoma capaces de producir trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) (como, TAS3a), que se acumulan diferencialmente tras el tratamiento con ABA en *P. patens*, lo que vincula la participación de estos sncRNAs con la vía de regulación mediada por ABA. Además, este grupo mostró que miR536 podría regular a los miembros de la familia ABI3, sugiriendo un rol de este miRNA en la tolerancia a la desecación en esta briofita. Todo esto permite sugerir que, en las plantas no vasculares, los microRNAs están involucrados en la respuesta a estrés.

La participación en la respuesta a estrés abiótico, mediada por miRNAs se ha descrito principalmente a partir del estudio de plantas vasculares y en menor medida a partir del estudio del musgo *P. patens*. Sin embargo, se sabe sobre lo que ocurre en las hepáticas, otro grupo de plantas no vasculares. Por lo tanto, éste resulta un interesante campo de investigación, ya que las grandes diferencias entre plantas vasculares y los diversos grupos de plantas no vasculares implican estrategias de adaptación distintas.

## 2 Antecedentes

*M. polymorpha* representa un nodo de interés evolutivo, desde el año 2008 se iniciaron los esfuerzos para la secuenciación de su genoma mediante el Community Sequencing Program en el Joint Genome Institute (Ishizaki *et al.*, 2008). Esta información podrá ser aprovechada para entender la respuesta molecular al estrés hídrico y en nuestro caso dirigida a la caracterización de la vía de regulación postranscripcional a través de miRNAs.

Como modelo, algunas de sus cualidades más útiles son la baja redundancia de su genoma, el estado haploide de los talos y las tecnologías de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. También, se han establecido las condiciones para inducir la transición de la fase vegetativa a la de reproducción sexual y se ha establecido un método de recombinación homóloga, así como edición genómica mediada por CRISPR-Cas9. Adicionalmente *M. polymorpha* tiene un set básico de los genes característicos de las plantas terrestres, tales como aquellos involucrados en la fase de transición en el crecimiento o la respuesta a hormonas como la auxina (Tsuzuki *et al.*, 2016) y la señalización por ABA (Bowman *et al.*, 2017).

En México, el grupo del Dr. Mario Arteaga-Vazquez (INBIOTECA, UV) llevó a cabo el análisis de los genes *AGO* y *DCL* en *M. polymorpha*, identificando a los miembros MpAGO1 y MpDCL1 de cada familia, los cuales están implicados en la maduración y función de los miRNAs, esto a partir de la primera versión del genoma de *M. polymorpha* (comunicación personal). En años recientes, el papel de los miRNAs en *M. polymorpha*, ha sido un tema de particular interés. Tsuzuki *et al.* (2015), caracterizó los RNAs pequeños de talos y estructuras reproductivas de *M. polymorpha* a través de secuenciación masiva. Reportó 196 miRNAs propios de *M. polymorpha*, tres miRNAs comunes con *P. patens* y seis comunes con *P. patens* y *A. thaliana*. Estos seis miRNAs conservados son miR319/159, miR160, miR166/165, miR171/170, miR390 y miR408. Este estudio reveló además que en *M. polymorpha* los genes *MIR* poseen uno o dos *loci* en el genoma en general y no se han duplicado como se observa en otras plantas. Además, identificó que la vía de regulación de los factores de transcripción SPL, que es regulada por miR156 en el resto de las plantas, es regulada en *M. polymorpha* por MpmiR529 y MpmiR11671.

En talos Tak1 de 4 semanas de edad crecidos en medio Gamborg B5, Pin-Chun Lin *et al.*, (2016), identificaron 7 familias de miRNAs conservadas entre las plantas terrestres, mediante través de estrategias computacionales y de secuenciación masiva: miR166, miR390, miR529c, miR171-3p, miR408a, miR160 and miR319a. Además, a través de análisis de degradoma (técnica basada en secuenciación masiva que permite la identificación de los fragmentos 3' de los RNAs degradados por sRNAs o incluso degradaciones aleatorias), se identificaron un total de 249 blancos de miRNAs. También, identificaron 15 nuevos miRNAs, entre los que destaca el módulo de regulación conformado por el pre-miR11707 que genera dos miRNAs MpmiR11707.1 y MpmiR11707.2 los cuales tienen como blanco el mRNA de la MpAGO1, lo que constituye un módulo de auto regulación de esta vía distinto al descrito en *A. thaliana* donde miR168 regula al mRNA de AGO1 (Vaucheret, 2004).

Bowman *et al.* (2017), realizaron un amplio estudio que describe las características genómicas de *M. polymorpha* desde una perspectiva evolutiva. En cuanto a la vía de regulación mediada por miRNAs, se identificaron 265 genes *MIR*, de los cuales pudieron identificar 264 pre-miRNAs en los diferentes contextos de expresión que evaluaron (gametofito y esporofito, órganos reproductores femenino y masculino, entre otros). Identificaron además que el 5 % de los genes *MIR* se encuentran en arreglo en tándem lo que se ha observado en *P. patens* y en plantas vasculares, sin embargo, parece estar más acentuado en *M. polymorpha*.

La Tabla 2.1 muestra la lista de miRNAs identificados en *M. polymorpha*, la segunda columna indica si se ha identificado en plantas modelo de otros linajes: Eudicotiledóneas (*A. thaliana*), Monocotiledóneas (*Oriza sativa*) y Briofitas (*P. pathens*, un musgo y *Pelia endiviifolia*, otra hepática) (Pin-Chun Lin *et al.*, 2016; Shih-Shun Lin y Bowman, 2018). En la tercera columna se indica si se ha encontrado su blanco en *M. Polymorpha* (Pin-Chun Lin *et al.*, 2016). Además, en las tres últimas columnas, se indica si existe evidencia de la regulación de este miRNA durante sequía, estrés salino o ABA en otras plantas modelo.

**Tabla 2.1 miRNAs de *M. polymorpha*, conservación en otros linajes, mRNAs blanco y participación en estrés en otras plantas (Parte 1)**

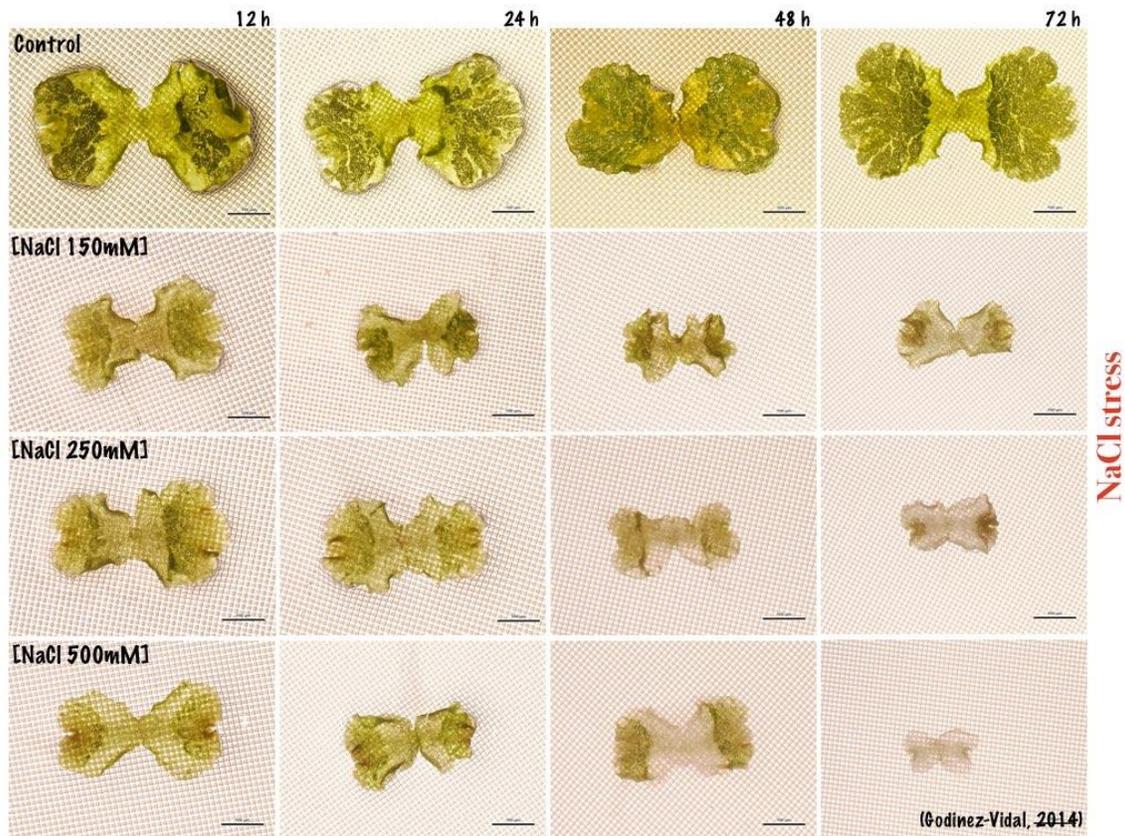
			En otras plantas el miRNA responde a:		
miRNA	Se encuen tra en:	mRNA blanco	NaCl	Déficit hídrico	ABA
miR160	Mpo, Pee, Ppt, Ath, Osa	AUXIN RESPONSE FACTOR 10 MpARF3			(Jeng-Shane Lin <i>et al.</i> , 2018)
miR165 / miR166	Mpo, Pee, Ppt, Ath, Osa	miR166a Homeobox-leucine zipper family miR166 MpC3HDZ1(MpC3HDZ/HD-ZIPII)	(Yan <i>et al.</i> , 2016)	(Yan <i>et al.</i> , 2016)	(Yan <i>et al.</i> , 2016)
miR170 / miR171	Mpo, Pee, Ppt, Ath, Osa	miR171-3p Negative regulator of gibberellin responses miR171 GRAS-HAM MATE efflux family protein	(Ghorecha <i>et al.</i> , 2014)	(Liu <i>et al.</i> , 2008)	
miR319 / 159	Mpo, Pee, Ppt, Ath, Osa	miR319a RWP-RK DOMAIN-CONTAINING 1 MYB DOMAIN PROTEIN 33 miR319 R2R3-MYB (S18) RWP-RKD gene miR319a/b MYB transcription factor (Mp <i>MYB33-like</i> )	(Patade y Suprasanna, 2010)	(López-Galiano <i>et al.</i> , 2019)	(Reyes y Chua, 2007)
miR390	Mpo, Pee, Ppt, Ath, Osa	Leucine aminopeptidase chloroplastic-like RNA Binding protein TAS3-like RNA, leucine-rich repeat receptor kinase protein	(He <i>et al.</i> , 2018)	(Seeve <i>et al.</i> , 2019)	(Lu <i>et al.</i> , 2018) <sup>1</sup>
miR408	Mpo, Pee, Ppt, Ath, Osa	miR408a.1 Cupredoxin superfamily protein EARLY NODULIN-LIKE PROTEIN 14 PLASTOCIANIN 1 PYRIMIDINE 1 Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein Chaperone DNAJ-domain superfamily protein HR-like lesion inducing protein-related SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY 1 P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein L-Ascorbate oxidase PLANTACYANIN EMBRYO DEFECTIVE 3121 EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATIONFACTOR 3G2 miR408a.2 Protein Disulfide Isomerase 4 miR408 Copper plastocyanin; laccase copper protein miR408a/b Laccase, uclacyanin	(Ma <i>et al.</i> , 2015)	(Ma <i>et al.</i> , 2015)	

<b>Tabla 2.1 miRNAs de <i>M. polymorpha</i>, conservación en otros linajes, mRNAs blanco y participación en estrés en otras plantas (Parte 2)</b>					
			<b>En otras plantas el miRNA responde a:</b>		
<b>miRNA</b>	<b>Se encuentra en:</b>	<b>mRNA blanco</b>	<b>NaCl</b>	<b>Déficit hídrico</b>	<b>ABA</b>
miR529 / 156	Mpo, Ppt, Osa	miR529c.1 Enoyl-CoA hydratase/isomerase A miR529c.2 R2R3 MYB transcription factor Homeodomain-like superfamily miR529c.3 Translation initiation factor miR529 SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 2 miR529ab KANADI family transcription factor miR529c Squamosa promoter binding-like family protein (Mp <i>SPL2</i> )	(Arshad <i>et al.</i> , 2017)	(Feyissa <i>et al.</i> , 2019)	(Dong <i>et al.</i> , 2021)
miR536	Mpo, Ppt	ABA insensitive 3 protein	(Xia <i>et al.</i> , 2016)	(Xia <i>et al.</i> , 2016)	(Xia <i>et al.</i> , 2016)
miR1030	Mpo, Ppt	NB-LRR family protein	○	(Zhou <i>et al.</i> , 2010)	○
miR11668	Mpo	Sin anotación funcional	-	-	-
miR11669	Mpo	miR11669.1 Sin anotación funcional	-	-	-
miR11670	Mpo	miR11670.2 EMBRYO DEFECTIVE 2184 ACCELERATED CELL DEATH 2	-	-	-
miR11671	Mpo	miR11671.1 SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 1	-	-	-
miR11672	Mpo	miR11672.2 Sin anotación funcional	-	-	-
miR11677	Mpo	miR11677 CATION-CHLORIDE CO-TRANSPORTER 1 HYPOCOTYL 7 Carbohydrate transmembrane transporter activity DEFECTIVE KERNEL 1 PIGMENT DEFECTIVE 191 Radical SAM domain-containing protein	-	-	-
miR11680	Mpo	miR11680a.1 LUX ARRHYTHMO NIMA-related serine/threonine kinase	-	-	-
miR11681	Mpo	miR11681.1 MIKC C MADS domain Peroxisome membrane-bound monodehydroascorbatereductase miR11681.2 ARF GAP domain	-	-	-

<b>Tabla 2.1 miRNAs de <i>M. polymorpha</i>, conservación en otros linajes, mRNAs blanco y participación en estrés en otras plantas (Parte 3)</b>					
			<b>En otras plantas el miRNA responde a:</b>		
<b>miRNA</b>	<b>Se encuentra en:</b>	<b>mRNA Blanco</b>	NaCl	Déficit hídrico	ABA
miR11685	Mpo	miR11685.1 AT-hook motif nuclear-localized twenty	-	-	-
miR11687	Mpo	miR11687.1 MIKC* MADS domain BARELY ANY MERISTEM 2 Leucine-rich receptor-like protein kinase CALCIUM-DEPENDENT LIPID-BINDING PROTEIN	-	-	-
miR11692	Mpo	miR11692.1 Pentatricopeptide repeat-containing protein INDOLE-3-ACETIC ACID-INDUCIBLE 33	-	-	-
miR11698	Mpo	miR11698.1 MYB HYPOCOTYL ELONGATION-RELATED Tetratricopeptide repeat (TPR)-like Superfamily	-	-	-
miR11707	Mpo	miR11707.1 <i>ARGONAUTE 1</i> Transcription regulator activity miR11707.2 <i>ARGONAUTE 1</i>	-	-	-

Nota: Datos tomados de (Pin-Chun Lin *et al.*, 2016), (Shih-Shun Lin y Bowman, 2018), (Tsuzuki *et al.*, 2016). Sólo se incluyeron los genes sin anotación funcional cuando era el único mRNA blanco asociado al miRNA. No se especifican los miR11666 al miR11890 (Tsuzuki *et al.*, 2016) ya que no asocian un mRNA blanco. Se cita la referencia cuando se ha encontrado evidencia de su participación. Abreviaturas. **Mpo:** *Marchantia polymorpha*, **Pee:** *Pellia endiviifolia*, **Ppt:** *P. patens*, **Ath:** *A. thaliana*, **Osa:** *Oryza sativa*. El miR319 tiene como blanco factores TCP (Teosinte branched1/Cinninata/proliferating cell factor) en angiospermas (Shih-Shun Lin y Bowman, 2018)

En nuestro grupo de trabajo, Godínez-Vidal *et al.* (2020), estudió el efecto del estrés salino (NaCl) y osmótico (manitol, deshidratación) en *M. polymorpha*, así como el efecto del pretratamiento con ABA y la posterior exposición a estrés salino en gemas y talos. La figura 2.1 muestra el fenotipo de *M. polymorpha* expuesta a concentraciones crecientes de NaCl (150, 250 y 500 mM), observado tras 12, 24, 48 y 72 horas.



**Figura 2.1 Talos de *M. polymorpha* sometidos a estrés salino.** Los talos fueron cultivados en medio Gamborg's B5 (fila superior) o Gambor's B5 con cantidades crecientes de NaCl (filas inferiores). De izquierda a derecha las columnas muestran tiempo de exposición. Barra: 1 mm (Godínez-Vidal *et al.*, 2020).

Se observa que el fenotipo (tamaño y coloración) de *M. polymorpha* se ve afectado por las concentraciones crecientes de NaCl en el medio, y que este efecto también aumenta con el tiempo de exposición. Esto sugiere que la exposición a NaCl implica un factor de estrés cuyo efecto depende de la concentración y tiempo de exposición.

Por otro lado, el fenómeno de relocalización de los cloroplastos en respuesta a cambios en el medio ambiente (luz y temperatura principalmente), está bien documentado en *M. polymorpha* (Kimura y Kodama, 2016; Ogasawara *et al.*, 2013). Godínez-Vidal (2020) mostró el fenómeno de relocalización de los cloroplastos en gemas y talos sometidos a estrés salino, por lo que se documentó como un marcador de exposición a estrés mediante microscopía de epifluorescencia.

Tomando en consideración los antecedentes mencionados, este proyecto tiene por objetivo continuar la caracterización de la respuesta de *M. polymorpha* durante estrés salino

generado por la exposición a NaCl enfocando el análisis en el efecto hídrico de esta condición y explorar la participación de la vía de regulación mediada por miRNAs.

### **3 Hipótesis**

*M. polymorpha* responde al déficit hídrico generado por NaCl a través de uno o varios mecanismos mediados por miRNAs.

### **4 Objetivos**

#### **Objetivos generales**

- ✓ Identificar los miRNAs que participan durante la respuesta a estrés hídrico generado por exposición a medio salino.
- ✓ Determinar si el estrés salino afecta algunos componentes de la biogénesis y complejo de acción de los miRNAs.

#### **Objetivos particulares**

- ✓ Establecer las condiciones de exposición a estrés salino y ABA en *M. polymorpha* y registrar algunos parámetros morfológicos y fisiológicos de la respuesta.
- ✓ Determinar si la exposición a salinidad afecta la acumulación de los mensajeros de MpDCL1 y MpAGO1 en *M. polymorpha*.
- ✓ Identificar los miRNAs presentes en la respuesta a estrés salino mediante secuenciación masiva de especies pequeñas de RNA.
- ✓ Comprobar mediante RT-qPCR, algunos de los miRNAs que se acumulan diferencialmente en respuesta a estrés salino de acuerdo con los resultados de secuenciación masiva.
- ✓ Explorar la relación entre la acumulación de los miRNAs que responden a estrés, y la acumulación de sus mRNAs blanco propuestos.

## **5 Materiales y Métodos**

### **5.1 Cultivo y propagación de *M. polymorpha***

Los experimentos se desarrollaron con talos de una línea establecida del gametofito masculino (Takaragaike-1 [Tak1]) de *M. polymorpha* L. que se mantuvo y propagó mediante reproducción asexual a través de gemas como estableció Ishizaki *et al.* (2008). A continuación, se detallan los procedimientos.

Se obtuvieron gemas de los conceptáculos tomándolas con una punta para micropipeta de un mL o con un palillo humedecido previamente con agua estéril. En el conceptáculo hay gemas en diferentes estados de maduración, las gemas maduras están en la parte superior del conceptáculo y se pegan fácilmente al palillo o la punta. Las gemas se depositaron en tubos de polipropileno con 1 mL de agua estéril. Algunas gemas flotan y otras se van al fondo, se usan preferentemente las gemas que flotan las cuales están maduras y son de mayor tamaño que las que se van al fondo. Es preferible usar gemas recién cosechadas, aunque si permanecen durante 48 horas a temperatura ambiente en los tubos con agua no se afecta su crecimiento (Figura anexa 1).

Las gemas se sembraron en cajas Petri con 25 mL de medio Gamborg's B5 (sin sacarosa ni vitaminas, Anexo A) descrito en Takenaka y Ohyama (2000). Se incubaron a 23 °C con un fotoperiodo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad), con 50-80  $\mu\text{E}$  ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) de luz blanca, durante siete días. En este punto, se sometieron a los tratamientos descritos a continuación.

### **5.2 Tratamiento de talos con NaCl y ABA**

Los talos de siete días de edad se expusieron a medio adicionado con concentraciones definidas de NaCl o ABA. También se analizaron talos expuestos a ABA y expuestos subsecuentemente a estrés salino. Los talos se cultivaron en mallas de organza colocadas sobre el medio de cultivo. La tela de organza se puede esterilizar y posee un entramado que permite a los rizoides de los talos pasar, manteniendo así el contacto con el medio. Este sistema nos permitió transferir los talos de un tratamiento a otro.

Para exponer a los talos a estrés salino, se preparó medio Gamborg's B5 y se esterilizó. Luego, se añadió NaCl para obtener 150, 250 y 500 mM de concentración final se homogenizó y vertió en cajas Petri. Para tratar a los talos con ABA, se preparó medio Gamborg's B5, se esterilizó y se suplementó con una solución stock de ABA (Sigma, MO, EUA) 10 mM, en cantidad suficiente para obtener la concentración final de cada tratamiento, 1, 5 y 10  $\mu$ M.

### **5.3 Microscopía**

La observación de los talos sometidos a las condiciones de interés se llevó a cabo con los microscopios Nikon SMZ1500 (estereoscópico) y Nikon E600 (óptico). El microscopio óptico cuenta con sistema de iluminación de epifluorescencia con el que se realizó la observación de los cloroplastos, usando la clorofila como fluorocromo. Las fotos se tomaron con una cámara Evolution MP (Media Cybernetics, MD, EUA) y se midieron con el software Image-Pro (Media Cybernetics).

### **5.4 Evaluación de la tasa fotosintética**

Se estimó la tasa fotosintética neta con el sistema de análisis de intercambio de gases portátil LI-6400XT (LI-COR Biosciences, Nebraska, EUA). Se empleó el modelo de sistema abierto (se suministra un flujo de gas y se analiza tras interactuar con la muestra). Se usó la cámara sugerida por el fabricante para analizar briofitas. Esta cámara constituye un sistema controlado en donde se coloca la muestra, los detalles se ilustran en el Anexo B.

El LI-6400XT mide de forma directa la tasa de consumo de CO<sub>2</sub> de una muestra *in vivo* y en tiempo real, en condiciones de luz, temperatura, CO<sub>2</sub> de referencia y flujo de aire fijos, a través de analizadores de gas por infrarrojos (IRGA, Infra Red Gas Analyzer, por sus siglas en inglés). La diferencia entre la cantidad de CO<sub>2</sub> de referencia en el aire suministrado y la cantidad de CO<sub>2</sub> en el aire que interactuó con la muestra refleja la asimilación de CO<sub>2</sub>. A partir de éste y otros parámetros, se estimó la tasa fotosintética (Evans y Santiago, 2014), considerando la siguiente fórmula:

$$\text{Fotosíntesis} = \frac{\mu \times \Delta CO_2}{s}$$

Donde:

$\mu$ : flujo de aire ( $\text{mol s}^{-1}$ )

s: masa del tejido vegetal (g)

$\Delta CO_2$ : diferencia de  $CO_2$  entre la referencia y la muestra ( $\text{mol mol}^{-1}$ )

Los parámetros establecidos para los experimentos fueron: la cantidad de luz irradiada a la muestra (80  $\mu\text{E}$ , la cantidad de luz en la que se cultivaron los talos), la temperatura (22 °C), la concentración de  $CO_2$  (400  $\mu\text{M}$ , por recomendación del fabricante), la masa (para cada experimento se midió la masa fresca y seca de los talos evaluados) y el flujo de aire (500  $\mu\text{M/s}$ ). Los talos se sometieron a oscuridad durante 1 h antes de evaluar su tasa fotosintética de acuerdo a lo indicado en la literatura (Evans y Santiago, 2014).

La humedad es un factor que puede interferir con el sistema de análisis de gases debido a que el espectro de absorción del  $CO_2$  y de  $H_2O$  son comunes en una región pequeña del espectro, por lo que el sistema implementa un desecante para enviar aire seco a la cámara de la muestra deshidratando los talos. Para evitar el posible efecto de deshidratación sobre los talos analizados por el flujo de aire seco, se evaluaron 300 segundos en cada muestra, además los talos se colocaron sobre un soporte de papel filtro hidratado durante el experimento. Para evaluar el sistema sin plántulas se realizaron las mediciones correspondientes con el filtro hidratado ilustrado en el ANEXO B I.

Cada muestra evaluada comprendió un grupo de 80-100 talos de siete días postsiembra, los cuales se consideraron como una muestra debido a la alta cantidad de biomasa necesaria para detectar el cambio en la concentración de  $CO_2$ . Se analizaron tres réplicas biológicas para cada grupo experimental.

Los resultados obtenidos del consumo de  $CO_2$  respecto al tiempo (Anexo B II), se usaron para determinar la estabilidad del sistema. Se usó la tasa fotosintética neta evaluada por el sistema en la zona estable de la gráfica de asimilación de  $CO_2$  (al menos 10 lecturas) y se graficó como fotosíntesis neta considerando las tres réplicas para cada grupo experimental.

## 5.5 Evaluación del potencial osmótico

El potencial osmótico se debe a la diferencia en concentración de solutos a través de una membrana. Para el análisis de la acumulación de osmolitos se colectó tejido de las plantas sometidas a las diferentes condiciones experimentales y se sometieron al procedimiento reportado por Castro-Camus *et al.* (2013), que a continuación se describe brevemente.

Se colectaron entre 4 y 10 mg de tejido en tubos de polipropileno de 0.5 mL, los cuales se prepararon previamente con un poco de fibra de vidrio en el fondo. Las muestras se sometieron a 5 ciclos de congelamiento (1 minuto en N<sub>2</sub> líquido) y descongelamiento (entre 23 y 25 °C durante 10 min). Después, cada tubo se perforó en el fondo con una aguja, y se puso dentro de un tubo de polipropileno de 1.5 mL generando un sistema de tamiz. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 14 000 rpm. La fibra de vidrio retuvo el tejido vegetal dejando pasar la fracción líquida. Se diluyó 1 µL de la fracción acuosa obtenida en 9 µL de agua ultrapura estéril. Estas muestras se analizaron en un osmómetro de presión de vapor (Wescor VAPRO Modelo 5600, Wescor, Inc., Logan UT USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este equipo mide la concentración de solutos en la muestra, reportando miliosmoles por kg (mOsm/kg) que definen la concentración osmolal. Los valores obtenidos se convirtieron a bares con la relación 1 Osm/kg = -25bar (Castro-Camus *et al.*, 2013).

## 5.6 Identificación de miRNAs que participan en estrés salino

Se identificó la población de miRNAs en talos de *M. polymorpha* sometidos a NaCl 150 o 250 mM y medio control, mediante secuenciación masiva. Los detalles se especifican a continuación.

### 5.6.1 Material biológico

Se cultivaron gemas de *M. polymorpha* como se describe en la sección 5.1 durante 7 días. Se expusieron alrededor de 240 talos a medio control (Gamborg's B5) o a medio salino (Gamborg's B5 + NaCl 150 o 250 mM), durante 24 h. Este esquema se llevó a cabo por duplicado. Tras el tratamiento, se corroboró el efecto de la salinidad observando la

relocalización de los cloroplastos, de manera consistente con los resultados previos. Finalmente, se colectó el tejido y se congeló en N<sub>2</sub> líquido. Se almacenó a -70 °C hasta ser procesado.

### 5.6.2 Obtención de RNA

El material biológico colectado en tubos de polipropileno se pulverizó con N<sub>2</sub> líquido, usando un pistilo, hasta formar un polvo fino. Se siguió el protocolo de extracción de RNA total con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante como se detalla a continuación.

Al tejido molido (entre 40 a 100 mg) se le agregó un mL de Trizol y se agitó vigorosamente en vortex hasta que se homogenizó la mezcla, se incubó 10 min a temperatura ambiente (21-23 °C). Las muestras se centrifugaron a 12,000 x g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo absoluto frío. Se mezclaron los líquidos agitando a mano vigorosamente. Las muestras se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente y a continuación, se centrifugaron a 12,000 x g durante 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 500 µL de isopropanol absoluto frío para precipitar el RNA. Las muestras se incubaron a -20 °C durante 12 h y posteriormente, se centrifugaron a 12 000 x g durante 10 min. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol absoluto. Se removió el etanol y el RNA se resuspendió con agua ultrapura libre de RNAsas.

Para la secuenciación masiva se obtuvieron al menos 10 µg de RNA de dos muestras de plantas expuestas a condiciones control, dos muestras de plantas expuestas NaCl 150 mM y dos muestras de plantas expuestas a NaCl 250 mM. Se analizó la calidad del RNA mediante espectrofotometría (NanoDrop, ThermoFisher). La relación 260/280 se mantuvo entre 1.8 y 2.0 y la relación 260/230 fue cercana a 1.8. Se evaluó la integridad del RNA mediante ensayo electroforético. Para ello, se resolvió 1 µg de RNA total de cada muestra en gel de agarosa al 2% en TBE 1X.

Las muestras se enviaron a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM (UUSMB, <http://www.uusmb.unam.mx/>). La preparación de la

muestra para secuenciación Illumina que se empleó se compone de tres fases: purificación de sRNAs, ligación de adaptadores, retrotranscripción y purificación. Las bibliotecas construidas de esta forma en la UUSMB se sometieron a secuenciación masiva (Sanger/Illumina 1.9).

El experimento de secuenciación masiva realizado tuvo dos limitantes. La primera fue la dificultad para obtener muestras de RNA íntegras para las plántulas sometidas a NaCl 250 mM, ya que al resolverse en gel mostraron un barrido entre 20 y 100 pb en lugar de bandas discretas. La segunda limitante fue que, por error, en ninguna muestra se partió de 1µg de RNA tras la purificación de sRNAs en la fase inicial de la preparación de las bibliotecas (comunicación personal).

### 5.6.3 Secuenciación masiva y análisis de los resultados

La UUSMB se realizó el análisis de calidad de los datos de secuenciación con la herramienta FASTX Toolkit (que son un conjunto de herramientas de línea de comando, para el procesamiento de archivos FASTA/FASTQ de lecturas cortas, (Hannon lab public galaxy, 2016; Studholme, 2012)). Con esta herramienta se eliminaron secuencias pertenecientes a los adaptadores y productos de degradación de RNAs de mayor tamaño. A continuación, las secuencias se anotaron con un conjunto de 121 secuencias identificadas como miRNAs de *M. polymorpha* de manera preliminar, en el grupo del Dr. Mario Arteaga-Vazquez (INBIOTECA, UV) y con los miRNAs reportados en la base de datos miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2008) para *A. thaliana*, *P. patens*, y *M. truncatula* y *Phaseolus vulgaris*, ya que en ese momento no se contaba con el genoma de *M. polymorpha* el cual se publicó posteriormente (Bowman *et al.*, 2017). Se buscó la coincidencia del 100% de identidad entre las secuencias identificadas y las bases de datos mencionadas, donde se incluyeron isoformas pertinentes a las familias de miRNAs.

La UUSMB realizó el análisis de expresión diferencial comparando las poblaciones de miRNAs identificados entre las muestras de NaCl 150 y 250 mM, respecto a las muestras control (análisis pareado) con el paquete DEGSeq2 (Love *et al.*, 2014) usando parámetros convencionales. El análisis mediante DEGSeq2 se realiza comúnmente pareado con n repeticiones entre dos tratamientos, se obtuvo un análisis de expresión diferencial entre el

tratamiento control y el tratamiento con NaCl 150 mM y otro análisis entre el tratamiento control y el tratamiento con NaCl 250 mM, con dos réplicas biológicas por tratamiento en cada caso. Cada análisis reportó una lista de miRNAs asociada entre otros datos a el valor de *fold-change* (FC, veces de cambio), el *p-value* (estadístico de significancia con un umbral establecido en  $p < 0.05$ ), el *padj* (*False Discovery Rate*, valor de *p* ajustado al número de datos estadísticamente significativos), el número de lecturas obtenida en cada réplica biológica y el número de lecturas normalizadas (al tamaño de la biblioteca).

Dado que la anotación de la secuenciación se realizó con un set preliminar de miRNAs de *M. polymorpha* y con la base de datos miRBase, los miRNA recibidos se identificaban con un nombre preliminar en *M. polymorpha* o el nombre dado a esta secuencia en miRBase. Por lo tanto cada miRNA se identificó con el nombre reportado para cada secuencia en Pin-Chun Lin *et al.*, 2016, Shih-Shun Lin y Bowman, 2018 y Tsuzuki *et al.*, 2015. Las secuencias que no se reportaron en estas publicaciones fueron descartadas.

La expresión diferencial para los miRNAs identificados se reportó en términos del FC, definido como el cociente de las expresiones de las medias de las expresiones en la escala original:  $FC_i^{(1)} = \frac{\bar{x}_i}{\bar{y}_i}$ . Para el gen *i*, si el grupo “x” toma un valor igual al del grupo “y”, entonces el cociente será 1 y no habrá diferencia entre estos grupos. En cambio, si el grupo “y” toma un valor mayor que “x” entonces el cociente adquirirá un valor menor que uno, indicando un aumento en el valor del gen *i* en el grupo “y”. Por otro lado, si “y” toma un valor menor que “x”, el cociente tendrá un número mayor que 1, indicando un decremento en el grupo “y” (McCarthy y Smyth, 2009). En los datos recibidos de la UUSMB, se identificó al grupo “x” el grupo control y al “y” como el grupo tratado con NaCl, por lo tanto, en los datos recibidos, los valores menores a 1 indicaron un incremento en la expresión del gen *i* en los talos expuestos al tratamiento, y correspondientemente, los valores mayores a 1 indican un decremento en la expresión del gen *i* en los talos expuestos al tratamiento, esto desafortunadamente es contraintuitivo pero no se solicitó repetir el análisis para establecer el FC relativo al control como generalmente se lleva a cabo este análisis y no al tratamiento.

Dado que en este análisis se expresó  $FC = \frac{\text{Control}}{\text{Tratamiento}}$  el valor obtenido del cociente representa el número de veces que cambia el control respecto al tratamiento, por lo que el

valor del tratamiento (valor de interés para realizar las comparaciones) corresponde al *recíproco* del FC del control, es decir **FC tratamiento vs control** =  $\frac{1}{FC\ control\ vs\ tratamiento}$ .

La estadística sobre el FC, el False Discovery Rate (FDR o *pval adjusted*) indica la posibilidad de que el dato presentado sea un falso positivo (que no se rechace la hipótesis nula que sostiene que no hay diferencia entre las medias de los grupos), en este caso la base de datos generó para todos un FDR=1 debido al tamaño de las bibliotecas obtenidas. Por esto, no se reporta en la tabla de resultados.

Para presentar los resultados del análisis de expresión diferencial, los valores de FC reportados en las bibliotecas se acotaron e identificaron de acuerdo con la Tabla 5.1. Los valores umbral para el FC se seleccionaron arbitrariamente de acuerdo con los valores observados (0-11) ya que comúnmente se escogen valores umbral de 1, 1.5 o 2 de *log2* FC (2, 2.8 y 4 de FC respectivamente) (McCarthy y Smyth, 2009), Debido a que nuestra base de datos es muy pequeña ese criterio no se aplicó. Tampoco se pudo seleccionar los genes diferencialmente expresados de acuerdo con el FDR sobre el FC, ya que este estadístico adquirió el valor de 1 en todas los miRNA, sugiriendo que no hay datos suficientes para tener una estadística confiable. Por esto, se estableció el valor  $1 \pm 0.1$  como umbral de corte para seleccionar los genes expresados diferencialmente.

**Tabla 5.1 Categorización de miRNAs expresados diferencialmente**

Categoría	Valor umbral	Identificación
Sin cambio	$1 \pm 0.1$	Amarillo
Aumento en salinidad respecto a control	$\leq 0.9$	Rojo
Disminución en salinidad respecto a control	$\geq 1.1$	Verde

Los valores de FC que representan un aumento en la acumulación en los talos tratados son menores a uno porque en el análisis de expresión diferencial para cada miRNA se dividió el número de secuencias encontradas en la muestra control sobre el número de secuencias de la muestra tratada, donde, si este último valor aumenta, el cociente disminuye. Por esta misma

razón los valores mayores a uno corresponden a una disminución en la acumulación en los talos tratados.

La principal desventaja en la interpretación de los datos de expresión diferencial es el número de secuencias en las que se basa este análisis, que representa un 10% del mínimo requerido para un análisis de expresión diferencial común (Git *et al.*, 2010) (Tabla 6.1). El principal efecto de esto es que las estadísticas sobre el análisis de expresión diferencial (*p*-value y FDR) indican que los datos presentados son producto del azar, es decir, no se puede negar la hipótesis nula. Además, la base de datos es pequeña y en la mayoría de los genes enlistados, la expresión diferencial está basada en unas pocas lecturas, si bien estas son lecturas normalizadas.

A pesar de estas limitaciones, nos percatamos que al partir de menor cantidad de RNA, sólo se mostraría a los miRNAs sobrerrepresentados en la población global. Incluso el que se encontrara en este análisis miRNAs conservados que se sabe que se relacionan con la respuesta a estrés en plantas terrestres, es un buen indicio para continuar el análisis con la información encontrada, aunque sin lugar a duda, lo mejor sería repetir la secuenciación masiva para acceder a una base de datos más rica y tener parámetros estadísticos confiables. No obstante, todos los análisis masivos requieren ser validados mediante RT-qPCR (Git *et al.*, 2010).

Los miRNAs con los que se continuó el análisis se seleccionaron de acuerdo con los siguientes criterios:

- Dar preferencia a los miRNAs conservados con otras plantas terrestres o que se hayan identificado previamente en *M. polymorpha*.
- El mejor *p-value* posible sobre el análisis de FC del grupo control vs NaCl 150 mM.
- El miRNA aparece en los dos análisis pareados (control vs NaCl 150 mM y control vs NaCl 250 mM).

## 5.7 Cuantificación de la acumulación relativa de miRNAs y mRNAs

La cuantificación de la acumulación relativa de miRNAs y de mRNA se llevó a cabo por RT-qPCR en un equipo StepOne™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) usando el sistema SYBR Green (Maxima SYBR Green/ROX, Thermo Scientific).

Para cuantificar los mRNAs de Mp*DCL1*, Mp*AGO1*, Mp*MYB33*, Mp*RKD* y Mp*LEA7* se emplearon oligonucleótidos específicos para cada mRNA (Lin *et al.* 2016, Garcias-Morales, 2017 y Godínez-Vidal, 2020). Para los miRNAs se usaron los oligonucleótidos específicos para cada miRNA y uno universal, propuestos para el sistema *stem-loop* síntesis de DNA complementario (cDNA) de miRNAs y cuantificación (Romero Pérez, 2015). La cuantificación estos dos grupos requiere en general la estandarización de las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos, la cuantificación y su análisis.

Para cada uno de los grupos de plantas analizados, la estimación de la acumulación relativa de los RNAs de interés se llevó a cabo a partir de tres réplicas independientes.

### 5.7.1 Estandarización de las condiciones de amplificación

Para estandarizar las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos se busca optimizar su eficiencia a través de un análisis por curva de eficiencia (de la reacción de amplificación) y de un análisis de curva de fusión del producto de PCR (del inglés *melting curve*). Durante estos experimentos:

- Se optimizó el valor del ciclo umbral (CT) para situarlo en un rango entre 20 y 28.
- Se vigiló la aparición de una curva de amplificación típica para la corrida del experimento. Esta curva posee una zona de ruido inicial, una zona de crecimiento exponencial y una zona de saturación.
- Se buscó obtener una curva de fusión con un solo producto de amplificación.
- Se probó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos en el PCR para que se mantuviera alrededor del 100%.

- Se buscó un ajuste del estadístico  $R^2$  o coeficiente de determinación cercano a uno.

### 5.7.2 Obtención de cDNA para mRNAs

Se trató 1  $\mu\text{g}$  de RNA con la enzima DNasa I (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante; en detalle: a 1  $\mu\text{g}$  de RNA se agregó 1  $\mu\text{L}$  del buffer 10X de reacción con  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de la Dnasa I RNasa-free (1U/ $\mu\text{L}$ ) y se llevó a un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura. Se incubó a 37 °C por 30 minutos. Luego se agregó 1  $\mu\text{L}$  de EDTA (50mM) y se incubó a 65 °C por 10 minutos.

Al RNA tratado con DNasa I del paso anterior (10  $\mu\text{L}$ ) se agregó 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido dT18 (100  $\mu\text{M}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura y se incubó a 65 °C por 5 minutos. A continuación, se agregaron 4  $\mu\text{L}$  del 5X Reaction Buffer (Thermo Scientific), 1  $\mu\text{L}$  de la RiboLock Rnase Inhibitor (Fermentas, 20 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix (10 mM) y 1  $\mu\text{L}$  de la RevertAid RT (Fermentas, 200 U/ $\mu\text{L}$ ), se mezclaron suavemente y se incubó durante 60 minutos a 42 °C. Para terminar la reacción se incubó a 70 °C durante 5 minutos, se enfrió en hielo y se utilizó para PCR o se almacenó a -20 °C.

### 5.7.3 Obtención de cDNA para miRNAs

Se partió de 1  $\mu\text{g}$  de RNA tratado con DNasa I como se describe en la sección 5.7.2. El cDNA se preparó con el método de síntesis Multiplex de cDNA de miRNAs por *stem-loop* (Romero Pérez, 2015). Este método requiere oligonucleótidos específicos tipo tallo-asa para generar el cDNA de cada miRNA (secuencias en el Anexo B). La síntesis se denomina multiplex porque la retrotranscripción se lleva a cabo simultáneamente para varios miRNAs. El cDNA se generó en dos reacciones, una que incluyó a los miR166, miR11742 y miR11753 y otra que incluyó a los miR11732, miR166 y miR319. En cada una de las reacciones se incluyó al U6 snRNA como gen de referencia.

Para la síntesis de cDNA se partió de 2  $\mu\text{L}$  del RNA tratado con DNasa I. Se agregaron 0.75  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido específico para cada miRNA (1  $\mu\text{M}$ ) y 0.25  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido del snRNA U6 (1  $\mu\text{M}$ ). Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10  $\mu\text{M}$ ) y se incubó a

65 °C por 5 minutos y luego en hielo por 1 min. Posteriormente se agregaron 4 µL del Buffer de Reacción 5X, 0.1 µL de inhibidor de RNAsas Ribolock y 0.25 µL de la transcriptasa reversa RevertAid. Se generó un control negativo de esta reacción en el que la transcriptasa reversa no se agregó sustituyendo su volumen en la reacción con agua ultrapura. Las muestras se incubaron como una reacción pulsada de acuerdo con la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2 Reacción pulsada de RT**

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	16 °C	30 min	1
2	30 °C	30 s	59
3	42 °C	30 s	
4	50 °C	1 s	
DR	70 °C	15 min	1

Nota: DR, detener la reacción.

#### 5.7.4 Cuantificación de mRNAs blanco

Todos los transcritos evaluados se cuantificaron en la dilución 1:1 de la reacción total de cDNA obtenido para cada muestra. Se usó el factor de elongación 1 $\alpha$  (MpEF1 $\alpha$ , Mapoly0024s0116.1 genoma de *M. polymorpha* v3.1, Phytozome: <https://phytozome.jgi.doe.gov>), referido como un gen de expresión constitutiva (Althoff *et al.*, 2014). El mRNA de MpEF1 $\alpha$  no se acumula diferencialmente durante la exposición de *M. polymorpha* al tratamiento con medio salino en los talos analizados (datos no mostrados). También se evaluó la acumulación del mRNA de la Actina I (Mapoly0016s0137, genoma de *M. polymorpha* v3.1, Phytozome), comúnmente empleado como gen de referencia, en este caso se observaron diferencias en su acumulación entre el grupo control y los tratamientos con NaCl (datos no mostrados), por lo que finalmente no se usó como referencia.

La reacción de qPCR consistió en la mezcla de 7.5 µL de SYBR Green Máster Mix 2.0 X (Thermo Scientific), 0.5 µL de oligonucleótido sentido (10 µM) y antisentido (10 µM), 5.5 µL de agua ultrapura y 1 µL de cDNA. Cada medición se llevó a cabo por triplicado. Se usaron oligonucleótidos específicos para cada mRNA (Anexo C-II) Los productos se amplificaron de acuerdo con las condiciones de la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3 Ciclos de amplificación para mensajeros**

Etapa de amplificación			
Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	95 °C	10 min	1
2	95 °C	30 seg	40
3	55 °C	30 seg	
Curva de fusión			
4	TE <sup>me</sup> °C	30 seg	1
5		$\Delta +0.5$ °C	
6	95 °C	15 seg	1

Nota: TE<sup>me</sup>, Temperatura específica para cada mRNA de: *MpEFI $\alpha$* = 60°C, *AGO1*= 58°C, *DCL1*= 60°C, *MYB33*= 62°C y *RKD*= 62 °C.

#### 5.7.5 Cuantificación de miRNAs

Los miRNAs se cuantificaron en la dilución 1:5 del cDNA total sintetizado. La reacción de qPCR contiene 7.5  $\mu$ L de SYBR Green Máster Mix 2.0 X (Thermo Scientific), 1  $\mu$ L de oligonucleótido sentido (2  $\mu$ M) y antisentido universal (2  $\mu$ M), 4.5  $\mu$ L de agua ultrapura y 1  $\mu$ L de cDNA. La cuantificación se llevó a cabo por triplicado. Se emplearon oligonucleótidos sentido específicos para cada miRNA y un oligonucleótido antisentido universal (Anexo C-D). Los ciclos establecidos para el PCR se muestran en la tabla 5.4.

**Tabla 5.4 Ciclos de amplificación para miRNAs**

Etapa de amplificación			
Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	95 °C	5 min	1
2	95 °C	30 seg	40
3	60 °C	30 seg	
Curva de fusión			
3	TE <sup>mi</sup> °C	1 min	1
4		$\Delta +0.2$ °C	
5	95 °C	15 seg	

Nota: TE<sup>mi</sup>, Temperatura específica para cada miRNA: miR166= 58 °C, miR319= 58 °C, miR529= 58 °C, miR11732= 59 °C, miR11742= 60 °C, miR11753= 60 °C.

### 5.7.6 Análisis de datos

La cuantificación de la acumulación de un producto de PCR puede ser absoluta o relativa. En este caso se evaluó la acumulación relativa de los mRNAs y miRNAs de interés. Para tal fin se puede emplear el método de curva estándar o, en nuestro caso, el método comparativo del valor del umbral de ciclos CT (*Cycle Threshold*), o  $\Delta\Delta CT$ .

Para calcular el  $\Delta\Delta CT$  se realizaron los siguientes cálculos dentro de cada réplica independiente compuesta de las muestras: Control, NaCl 150 y 250 mM. Primero se obtuvo el valor de CT mediante RT-qPCR. El CT refleja la abundancia de la especie detectada mediante PCR en la muestra, y corresponde al ciclo en el que la amplificación del DNA comienza a incrementarse exponencialmente. Se realizaron tres réplicas técnicas por lo que se obtuvieron tres valores de  $CT_{1-3}$ . Luego, mediante una diferencia simple, se normalizaron los valores de  $CT_{1-3}$  de cada mRNA o miRNA respecto los valores encontrados para el gen de referencia (*MpEF1 $\alpha$*  y *U6* snRNA, respectivamente), obteniendo el valor  $\Delta CT_{1-3}$ . Posteriormente estos valores se multiplicaron por -1, y se usaron como exponentes de una potencia de base dos (ya que en cada ciclo se duplica la cantidad de DNA obtenido) de la siguiente manera:  $2^{-\Delta CT_{1-3}}$ . Finalmente, se dividieron los valores de  $2^{-\Delta CT_{1-3}}$  obtenidos en los tratamientos entre el promedio los valores de  $2^{-\Delta CT_{1-3}}$  de la muestra control, de acuerdo con la fórmula:  $\Delta\Delta CT_{1-3} = 2^{-\Delta CT_{Tratamiento}_{1-3}} / 2^{-\Delta CT_{Control}_{Promedio}}$ . Los valores de  $2^{-\Delta CT_{1-3}}$  de la muestra control se dividieron sobre su propio promedio de acuerdo con:  $\Delta\Delta CT_{1-3} = 2^{-\Delta CT_{Control}_{1-3}} / 2^{-\Delta CT_{Control}_{Promedio}}$ . por lo que el valor de referencia que se obtuvo fue uno, representado en todas las gráficas como una línea punteada.

Para graficar la acumulación de cada mRNA o miRNA, se obtuvo el promedio de los tres valores correspondientes a réplicas técnicas  $\Delta\Delta CT_{1-3}$ , y se usó como el valor de  $\Delta\Delta CT$  de una réplica independiente. En las gráficas presentadas, la dispersión de datos en torno a la cada barra corresponde a los valores de  $\Delta\Delta CT$  de tres réplicas independientes.

Los cálculos se hicieron con el programa Microsoft Excel (2016) y las gráficas y análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism 6, considerando el error estándar como medida de dispersión. Para evaluar la significancia estadística, se realizó el análisis de ANOVA de una vía para comparar el efecto de los tratamientos con NaCl en la acumulación

de mRNAs y miRNAs. Además, para las comparaciones entre grupos se realizó la prueba de HSD de Tukey  $p(\alpha) = 0.05$ .

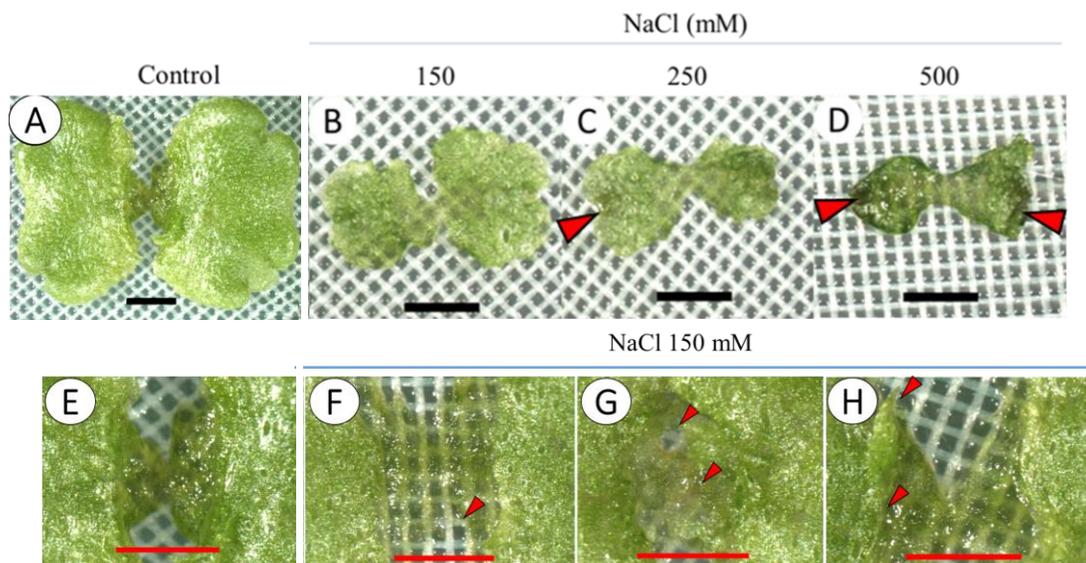
## **6 Resultados**

Con el fin de conocer la participación de la vía de regulación postranscripcional mediada por miRNAs en la respuesta a estrés de *M. polymorpha*, se estudiaron talos de 7 días de edad, expuestos a diferentes concentraciones de NaCl. Se evaluó el efecto del medio salino a través de los cambios morfológicos, la tasa fotosintética, el potencial osmótico y la acumulación del mRNA de la MpLEA7, empleado como marcador de respuesta a estrés. Posteriormente se exploró la participación de los componentes centrales de la vía de regulación mediada por miRNAs (MpDCL1 y MpAGO1) evaluando la acumulación de sus transcritos respectivos. Por otro lado, se identificaron los miRNAs que se acumulan diferencialmente en respuesta a salinidad, mediante secuenciación masiva. Se seleccionaron seis miRNAs que se acumularon diferencialmente, en respuesta a salinidad y se evaluó su acumulación mediante RT-qPCR.

### **6.1 Respuesta morfológica de talos de *M. polymorpha* durante estrés salino**

Se observó un efecto a nivel morfológico en los talos expuestos a las tres concentraciones de NaCl, desde un efecto leve en los talos expuestos a NaCl 150 mM hasta un efecto severo observado en los talos expuestos a NaCl 500 mM (Figura 6.1). En los talos se identificaron regiones que presentan pérdida de turgencia, clorosis y oscurecimiento debido probablemente a oxidación del tejido. Además, al observar estas regiones al microscopio aparentan pérdida de integridad celular. Estas lesiones son más perceptibles en la zona central del talo la cual tiene contacto estrecho con el medio de cultivo y en las zonas meristemáticas (Figura 6.1 C y D). También se observó que el área de los talos expuestos a salinidad parece ser menor respecto a los talos control; sin embargo, no se comparó de manera sistemática el área en estos experimentos. Datos independientes del mismo grupo que evaluaron el tamaño del área de los talos mostraron que la diferencias aparente en las áreas son significativas entre

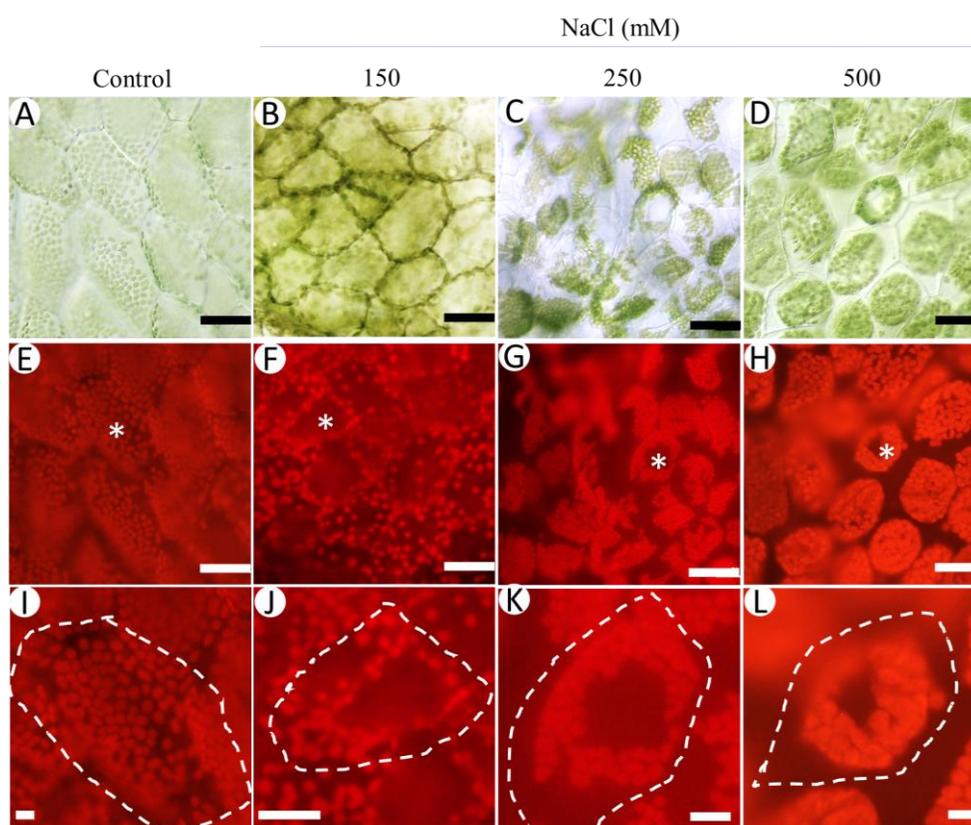
los talos control y los talos expuestos por 24 horas a las tres concentraciones de NaCl (Godinez-Vidal *et al.*, 2020).



**Figura 6.1 Efecto de diferentes concentraciones de NaCl en *M. polymorpha*.** Panel A. Talo control. Paneles B-D. Se muestra el efecto de tres concentraciones de NaCl en talos de *M. polymorpha* expuestos durante 24 horas. Se observa que la severidad incrementa con la concentración de NaCl. Las regiones dañadas se indican con cabezas de flecha. Paneles E-H. Efecto del tratamiento con NaCl 150 mM en la zona central del talo. Se ilustra en el panel E la región central de un talo crecido en medio control. Los paneles F-H ilustran tres talos expuestos a NaCl 150 mM donde se ejemplifican los efectos del tratamiento. Las cabezas de flecha indican en F: el sitio donde se observó clorosis y pérdida de turgencia, en G: ruptura del tejido (flecha superior) y clorosis (flecha inferior), y en H: crecimiento anómalo de tejido (la protuberancia inicia en la primera flecha y termina en la segunda). Las fotografías son representativas de un grupo de 80-100 talos por tratamiento. Las barras de escala corresponden a 1mm.

A grandes rasgos, se observó un fenotipo similar entre los talos tratados con NaCl 150 mM y los talos control, ya que conservan el mismo color en los dos lóbulos del talo, (Figura 6.1 B). Sin embargo, un análisis más detallado, permitió observar el efecto del tratamiento con NaCl 150 mM en la región central del talo (Figura 6.1 F-H), donde se observó clorosis y pérdida de turgencia, ruptura del tejido, (Figura 6.1 G), e incluso regiones con crecimiento anormal (Figura 6.1 H), donde se observó la región central del talo clorótica y sin turgencia, y adyacente a esta, se observó que el tejido formó un borde delimitado por las flechas.

Dado que previamente se ha observado el efecto del estrés abiótico en la distribución de los cloroplastos de *M. polymorpha* (Ogasawara *et al.*, 2013), se analizó la distribución de los cloroplastos en los grupos experimentales a través de microscopía de campo claro y de epifluorescencia. Los campos analizados corresponden a regiones de la epidermis superior y parénquima fotosintético ubicado cerca a los meristemos. Cabe señalar que los campos no muestran el mismo tipo celular en todos los paneles, por lo que se observan distintas formas (Figura 6.2).



**Figura 6.2 Relocalización de cloroplastos inducida por la exposición a diferentes concentraciones de NaCl.** Se muestran imágenes de campo claro (A- D) y autofluorescencia de la clorofila en cloroplastos de células de la epidermis. (E, F, I, J) y parénquima fotosintético (G, H, K, L). Los asteriscos indican la célula ampliada (E-H). La línea punteada indica el límite de la célula ilustrada (I-L) La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$  en los paneles E-H y a 10  $\mu\text{m}$  en los paneles I-L por el acercamiento a cada célula.

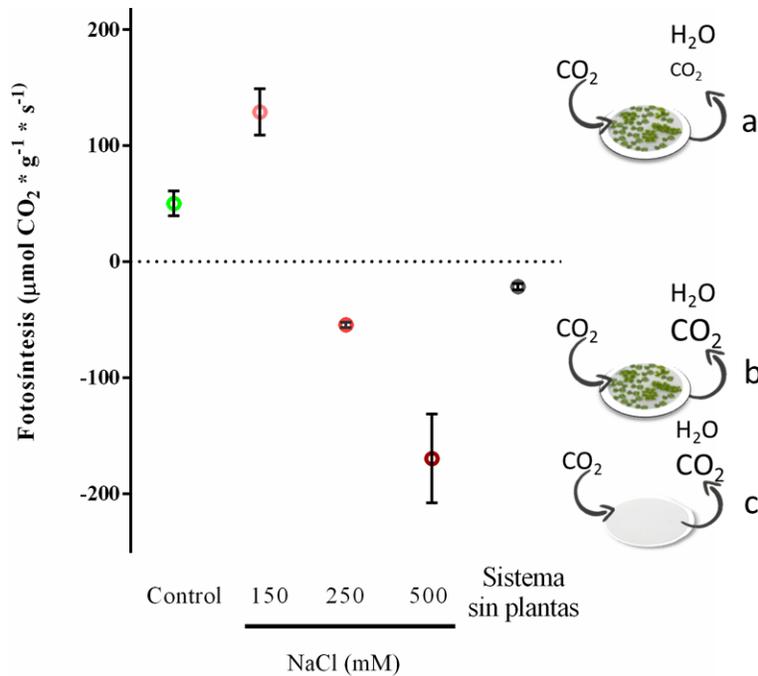
En talos control los cloroplastos se encuentran homogéneamente distribuidos (Figura 6.2 A, E, I), pero en los talos tratados con NaCl, se observó que los cloroplastos se ubicaron hacia la periferia dejando un espacio en el centro de las células (Figura 6.2 F, I, L). Esto se observó de manera heterogénea debido al plano enfocado y a la disposición espacial del grupo de células en el campo de observación en regiones del talo y en células de la epidermis inferior.

La relocalización de los cloroplastos hacia la periferia en los talos tratados con NaCl, nos permite sugerir que los tres tratamientos constituyen una condición de estrés y que el fenotipo observado, es consistente con el fenómeno de relocalización de los cloroplastos documentado previamente, en gemas y talos sometidos a estrés osmótico (Godinez-Vidal *et al.*, 2020), estrés por bajas temperaturas, (Akter *et al.*, 2014; Ogasawara *et al.*, 2013) y exposición a ABA (Akter *et al.*, 2014; Godinez-Vidal *et al.*, 2020). Cabe mencionar que los talos tratados con NaCl 500 mM perdieron integridad y eran muy frágiles (Figura 6.1 D) lo que dificultó su manipulación.

## **6.2 Algunos parámetros fisiológicos de la respuesta a estrés salino**

### **6.2.1 Tasa fotosintética**

Se evaluó la tasa fotosintética neta (asimilación neta de CO<sub>2</sub>) de los talos con el instrumento LI-6400XT (ver sección 5.4). La figura 6.3 muestra la tasa fotosintética (eje “y”) evaluada en los talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl y el control (eje “x”). En la gráfica se ilustran dos zonas, la zona con valores en “y” >0 interpretados como fotosíntesis activa y la zona de valores en “y” <0 donde no hay fotosíntesis. En cada zona se ilustra el intercambio de gases que ocurre en las muestras analizadas mediante este sistema (esquemas a-c). Se incluyó como referencia, el resultado obtenido al evaluar el filtro húmedo sin plantas (esquema c), con el fin de conocer el efecto del vapor de agua adicional que suministró el filtro húmedo en la cuantificación del CO<sub>2</sub>, ya que este es un factor que la afecta (sección 5.4).



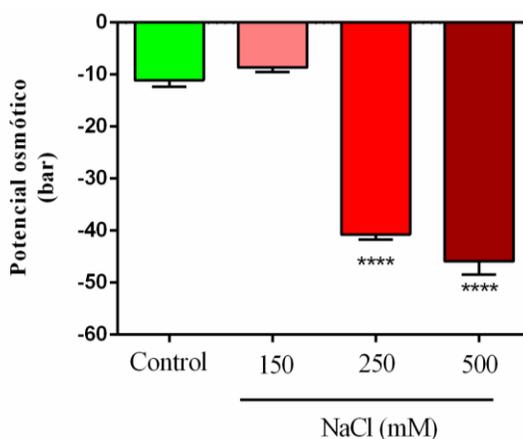
**Figura 6.3 Tasa fotosintética neta ( $\mu\text{mol CO}_2 * \text{g}^{-1} * \text{s}^{-1}$ ) evaluada en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl.** Los valores en “y” > 0 indican fotosíntesis activa; los valores en “y” < 0 indican fotosíntesis inactiva. Los talos expuestos a NaCl 150 mM tienen actividad fotosintética mientras que ocurre lo opuesto en talos expuestos a NaCl 250 y 500 mM. Las barras indican error estándar, sin embargo, los grupos no son cuantitativamente comparables. Cada réplica se compone de 80 a 100 talos, con tres réplicas independientes. Los esquemas indican el intercambio de gases en cada zona de la gráfica: **a**, consumo de  $\text{CO}_2$ ; **b**, sin consumo de  $\text{CO}_2$  y liberación de  $\text{CO}_2$ ; **c**, filtro hidratado sin plantas.

Los talos cultivados en condiciones control y los talos expuestos a NaCl 150 mM fueron capaces de efectuar fotosíntesis, evaluada a través de la asimilación neta de  $\text{CO}_2$ , sin embargo, los talos expuestos a NaCl 250 y 500 mM no efectuaron fotosíntesis. La tasa fotosintética ( $\mu\text{mol CO}_2 * \text{g}^{-1} * \text{s}^{-1}$ ) de las plantas expuestas a NaCl 150 mM indicó lecturas con valores superiores al control, sin embargo, cabe aclarar que se decidió no comparar cuantitativamente las muestras, ya que hay factores que afectan el sistema implementado para medir la tasa fotosintética y que se discutirán más adelante. Estos resultados nos permiten concluir que la tasa fotosintética se ve afectada negativamente durante el tratamiento con NaCl 250 y 500 mM pero no durante el tratamiento con NaCl 150 mM.

### 6.2.2 Evaluación del potencial osmótico

Se evaluó el potencial osmótico en los talos expuestos a NaCl, debido a que las plantas acumulan osmolitos compatibles para contender con el estrés hídrico ya que esto incrementa el potencial osmótico celular y en consecuencia el potencial hídrico, lo que determina la dirección del flujo del agua (Light, 2013).

Se observó que el potencial osmótico no disminuyó significativamente cuando los talos se expusieron a NaCl 150 mM durante 24 h, sin embargo, sí disminuyó significativamente en los talos expuestos a NaCl 250 o 500 mM durante el mismo tiempo (Figura 6.4). Este resultado sugiere que la exposición a NaCl 150 mM por 24 h no afecta el potencial osmótico de los tejidos de *M. polymorpha*, mientras que la exposición a 250 o 500 mM de NaCl si lo hace. Cabe tomar en cuenta que, en otra serie de experimentos, se registró una disminución significativa del potencial osmótico en talos expuestos a 150 mM de NaCl, y esta disminución significativa fue reproducida por experimentos independientes del grupo, lo que se discutirá más adelante.

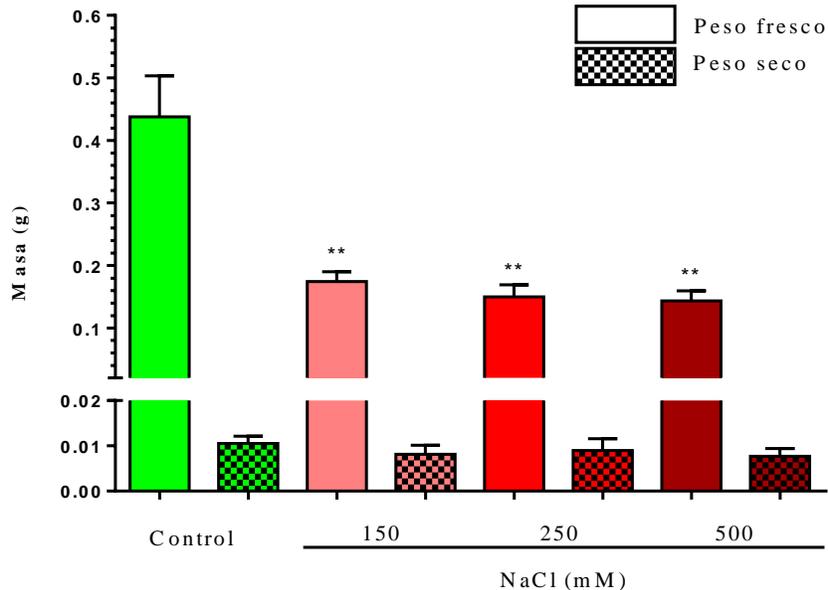


**Figura 6.4. Potencial osmótico en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl.** La gráfica muestra que el potencial osmótico no cambia en los talos expuestos a NaCl 150 mM pero disminuye significativamente en los talos expuestos a NaCl 250 o 500 mM. Las barras indican el error estándar de tres réplicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía F (3,8) = 468.9 y comparaciones entre grupos con la prueba de Tukey encontrando diferencia significativa de los tratamientos con NaCl 250 y 500 mM respecto al grupo control: \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ .

La disminución del potencial osmótico puede deberse a dos factores: la pérdida de agua, o la acumulación de osmolitos compatibles en el talo. En el talo, la pérdida de agua es ocasionada por el aumento en evapotranspiración de los talos en comparación con la absorción del agua, y/o por el movimiento del agua del talo hacia el medio debido a la diferencia en el potencial hídrico. Para saber si el cambio en la osmolaridad se debe a la pérdida de agua además de la posible acumulación de osmolitos, se comparó la masa de los talos tratados con diferentes concentraciones de NaCl respecto a control.

### 6.2.3 Evaluación del peso fresco y peso seco

Se evaluó el peso seco y el peso fresco en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl. Se observó que el peso fresco disminuyó significativamente en los talos expuestos a NaCl 150, 250 o 500 mM, un 39, 34 y 32 % respectivamente (Figura 6.5). Aunque la diferencia entre los tratamientos respecto a control es estadísticamente significativa de acuerdo con las pruebas de ANOVA-Tukey, las diferencias entre los tratamientos de NaCl no fueron estadísticamente significativas. De aquí que, el potencial osmótico disminuye desde el tratamiento con NaCl 150 mM pero no disminuye más al incrementar la concentración de NaCl. Por otro lado, el peso seco no reflejó diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control.



**Figura 6.5 Pérdida de agua en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl.** La gráfica muestra el peso fresco y el peso seco de talos en condiciones control o expuestos a medio salino. Las barras indican el error estándar de tres réplicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía F (3,8) = 15.63 y comparaciones entre grupos con la prueba de Tukey encontrando diferencias significativas en el peso fresco de los talos tratados con 150, 250 y 500 mM de NaCl respecto a control: \*\* =  $p = 0.001 - 0.01$ . Para el peso seco, la prueba de ANOVA de una vía F (3, 8) = 0.3778  $p = 0.7717$  indicó que no hubo diferencia entre los tratamientos y el grupo control.

Estos resultados sugieren que la disminución en la masa de los talos expuestos al medio salino se debe a la pérdida de agua. Este fenómeno podría explicar el cambio en el tamaño de talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl, evaluado por Godinez-Vidal *et al.*, (2020), sobre todo en aquellos el caso de los talos expuestos a NaCl 500 mM, donde el cambio en el tamaño fue más evidente (Figura 6.1 D). La pérdida de agua en los talos expuestos a 500 mM es similar a la pérdida en los talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM; sin embargo, en estos últimos el efecto en el tamaño no es tan evidente, por lo que no existe una correspondencia completa entre la disminución del área del talo respecto a la pérdida de agua, o las técnicas y parámetros medidos no son suficientes para describir este fenómeno. No obstante, estos resultados permiten inferir que la pérdida de agua observada en los

tratamientos aumenta la concentración del contenido celular, lo que contribuye a la disminución del potencial hídrico sin descartar la acumulación de osmolitos compatibles.

Los talos expuestos a NaCl 500 mM respondieron, en los parámetros analizados, de manera similar a los talos expuestos a NaCl 250 mM en cuanto a que se observó que los cloroplastos se relocalizaron hacia la periferia (Figura 6.2), no realizaron actividad fotosintética (Figura 6.3), disminuyó su potencial osmótico (Figura 6.4) y perdieron agua de manera similar (Figura 6.5). Además, se ha descrito, mediante experimentos de recuperación y sobrevivencia, que talos expuestos a NaCl 500 mM durante 24 h, pueden recuperarse tras ser transferidos a medio Gamborg B5 control (Godínez-Vidal *et al.*, 2020). Sin embargo, a nivel morfológico el efecto es mucho más severo (Figura 6.1), ya que los talos expuestos a NaCl 500 mM pierden su integridad. La pérdida de turgencia y la fragilidad de los talos, por un lado, dificultaron su manipulación y por el otro, permitió inferir que esta condición representa un estrés severo. De esta manera, se decidió no incluir este grupo en los análisis mediante RT-qPCR ni de secuenciación masiva.

Con estos resultados se confirma que las condiciones de estrés salino estudiadas tienen un efecto que es posible observar a través de los parámetros fisiológicos analizados, en los talos expuestos a NaCl 150 y 250 mM. Ya que la respuesta fisiológica y morfológica depende de cambios moleculares, se analizó la acumulación del transcrito de una proteína asociada con la respuesta a estrés hídrico en plantas.

### **6.3 Efecto del ABA en de *M. polymorpha***

El ABA es considerada la principal hormona de señalización durante condiciones de estrés en plantas. Se ha documentado que en respuesta a diversos estímulos estresores, la cantidad de ABA en las plantas aumenta, participando en el proceso de señalización celular que permite contender con el estrés. Los resultados obtenidos por Godínez-Vidal *et al.*, (2020) sugieren que en *M. polymorpha* los niveles endógenos de ABA cambian en respuesta a déficit hídrico y estrés salino, incrementándose de forma similar a lo que ocurre en plantas

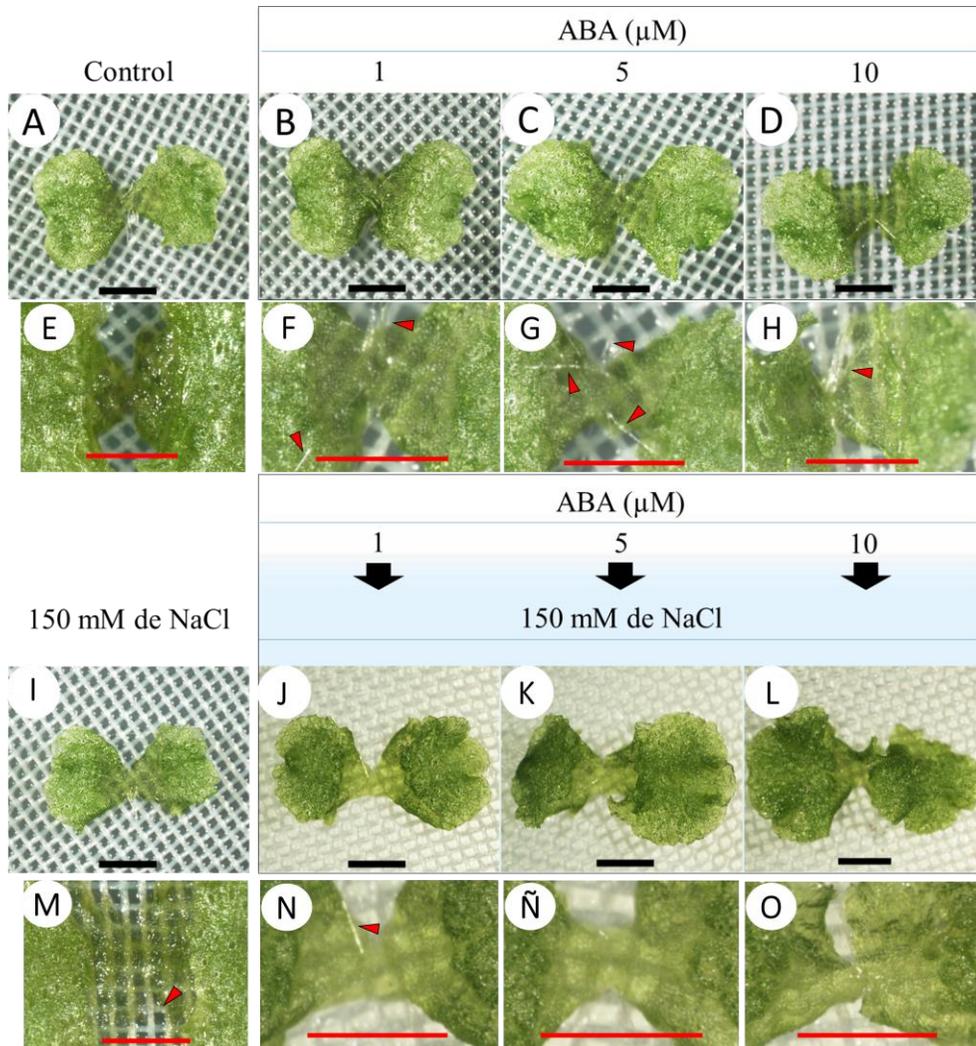
vasculares . Esto sugiere que ABA es un mediador de la respuesta a estrés hídrico y salino en plantas no vasculares.

De manera interesante, la literatura ofrece observaciones donde el tratamiento con ABA puede generar resistencia a la deshidratación en briofitas (Pence *et al.*, 2005). Este fenómeno no se ha documentado extensamente en *M. polymorpha*, por lo que resultó interesante realizar un acercamiento al efecto “protector” que pudiera tener el pretratamiento con ABA en los efectos generados por la exposición al NaCl. Se decidió hacer este análisis con talos expuestos a NaCl 150 mM, debido a que los efectos observados durante este tratamiento, aunque discretos o parciales, son suficientes para determinar si pudo existir o no un efecto de protección. Además, el estudio de talos tratados con 150 mM de NaCl es interesante para continuar la exploración de la respuesta a estrés en el futuro, ya que como se demostró en la sección 6.2.1, en estos talos se mantuvo la actividad fotosintética a diferencia de los talos tratados con mayores concentraciones de NaCl, observación que se discutirá más adelante.

Con esto en mente y tomando como ventaja la experiencia en la caracterización de los talos expuestos a NaCl, se exploró la respuesta a ABA en *M. polymorpha*.

### 6.3.1 Morfología del talo en respuesta al ABA

Se crecieron talos por 7 días tras los cuales un grupo permaneció en condiciones control y otros grupos se trataron con medio que contenía ABA a la concentración de 1, 5, y 10  $\mu$ M. Después de 24 h, un subgrupo se analizó para observar el efecto de ABA en los talos, y el otro subgrupo se llevó a medio con NaCl 150 mM, incluyendo como control un grupo sin pretratamiento de ABA. Después de 24 h de tratamiento se analizaron las muestras. A continuación, se muestra el efecto de estos tratamientos en talos de *M. polymorpha* (Figura 6.6).



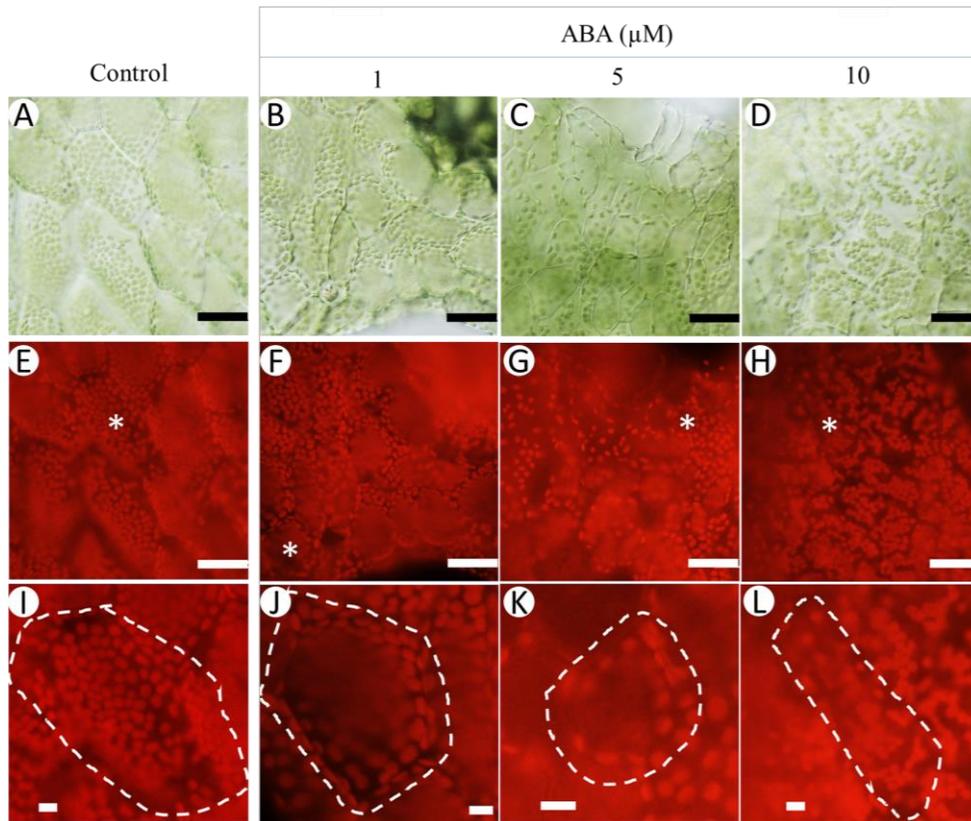
**Figura 6.6 Efecto del tratamiento con ABA y exposición a NaCl 150 mM.** Se muestran los talos tratados con ABA (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h (B-D, F-H). Los paneles A y E muestran al grupo control como referencia. También se muestra el efecto del pretratamiento con ABA durante 24 h y la posterior exposición a NaCl 150 mM durante 24 h (J-L, N-O). Los paneles I y M muestran el efecto del tratamiento con NaCl 150 mM como referencia. Las cabezas de flecha indica en M la región dañada, y en F-H y N indican rizoides originándose de la epidermis superior en la zona central del talo, Las fotografías son representativas de un grupo de 80-100 talos por tratamiento. Las barras de referencia corresponden a 1 mm.

El tratamiento con 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de ABA no afecta negativamente el fenotipo de los talos en cuanto a color, forma y turgencia (Figura 6.6 B-D), En la región central del talo, se observó que en los tratamientos con ABA, es mucho más frecuente encontrar rizoides creciendo a partir de la epidermis superior del talo (Figura 6.6 E-H) respecto a los talos

control, sin embargo, no se cuantificó la frecuencia de aparición de rizoides en la epidermis superior en ambos grupos. Durante los experimentos, se observó un aumento en el tamaño de los talos tratados con ABA y esto fue correspondiente a la dosis, pero esta tendencia tampoco se cuantificó.

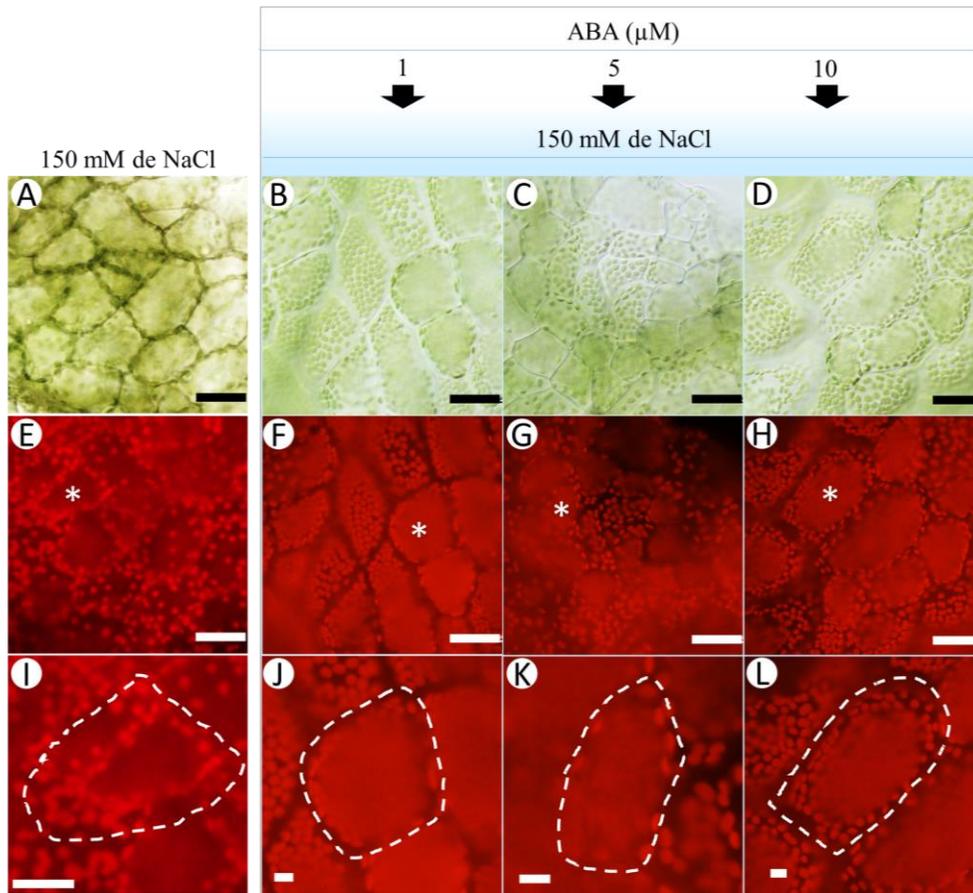
En los talos expuestos a NaCl 150 mM no se observaron diferencias respecto al control al comparar los lóbulos del talo; sin embargo, se observó clorosis y pérdida de turgencia en la zona central (Figura 6.6 J), de acuerdo con los resultados de experimentos previos descritos en la sección 6.1. En los talos pretratados con ABA 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  y posteriormente expuestos a NaCl 150 mM, no se observó clorosis o pérdida de turgencia en los lóbulos del talo; notablemente, tampoco se observaron ninguno de los dos efectos de daño en la zona central del talo (Figura 6,6 J-L y N-O), a diferencia de lo observado en los talos expuestos a NaCl 150 mM. Esto sugiere que el pretratamiento con ABA exógeno, incluso con ABA 1 $\mu\text{M}$ , evita la clorosis y pérdida de turgencia en la zona central de los talos expuestos a NaCl 150 mM. No se observó una diferencia dependiente de la concentración ABA con la que se haya hecho el pretratamiento, en el efecto observado. Reportes previos han sugerido un papel protector del ABA ante estrés salino (Pence *et al.*, 2005), sin embargo, para robustecer estas observaciones, es necesario repetir este experimento exponiendo a los talos pretratados con ABA a un estrés más severo, ya sea aumentando el tiempo de exposición o la concentración de NaCl empleada.

A continuación, se observó el efecto de la exposición a ABA en la disposición de los cloroplastos y se comparó, el fenotipo con el pretratamiento de ABA y la posterior exposición a NaCl. En figura 6.7 se presentan micrografías de células de la epidermis de *M. polymorpha*. En los talos tratados con ABA 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , se observó que los cloroplastos se relocalizaron hacia la periferia celular (Figura 6.7 E-L).



**Figura 6.7 Relocalización de los cloroplastos en talos tratados con ABA.** Se muestran los cloroplastos en campo claro (A-D) y por autofluorescencia de la clorofila (E-L) en células de la epidermis de talos expuestos a ABA (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) o a tratamiento Control durante 24 h. Los asteriscos indican la célula amplificada (E-H). La línea punteada indica el límite de la célula ilustrada (I-L). La barra de referencia corresponde a 50  $\mu\text{m}$  en los paneles A-H y corresponde a 10  $\mu\text{m}$  en los paneles I-L por el acercamiento a cada célula.

Por otro lado, se examinó la distribución de los cloroplastos en talos pretratados con ABA y expuestos posteriormente a NaCl 150 mM (Figura 6.8). Como control de comparación se ilustra el efecto observado en los cloroplastos de los talos expuestos a NaCl 150 mM. Los cloroplastos se distribuyen hacia la periferia en los talos pretratados con ABA y luego expuestos a NaCl 150 mM, mostraron el mismo fenotipo entre ellos y respecto a los talos expuestos a únicamente a cada concentración de ABA (Figura 6.8)



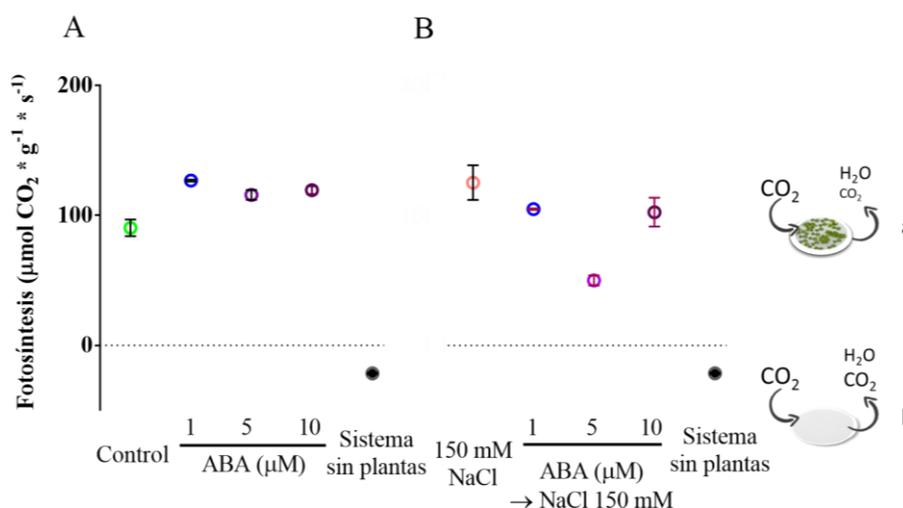
**Figura 6.8 Relocalización de los cloroplastos en talos tratados con ABA y pretratados con ABA y expuestos posteriormente a NaCl 150 mM.** Se muestran los cloroplastos en campo claro (A-D) y por autofluorescencia de la clorofila (E-L) en células de la epidermis de talos expuestos a ABA (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h o a NaCl 150 mM. Los asteriscos indican la célula ampliada (E-H). La línea punteada indica el límite de la célula ilustrada (I-L) La barra de referencia corresponde a 50  $\mu\text{m}$  en los paneles A-H y corresponde a 10  $\mu\text{m}$  en los paneles I-L por el acercamiento a cada célula.

Se observa difuminada la señal de fluorescencia en el centro de la célula, ya que los cloroplastos no se encuentran en el plano enfocado, lo que es una limitación de esta técnica (Figura 6.8 J-L). No obstante, los cloroplastos que se observan enfocados se encuentran localizados hacia el borde de las células. Godinez-Vidal *et al.*, (2020) llevó a cabo el estudio detallado de la relocalización de los cloroplastos inducida por el tratamiento con ABA exógeno mediante la técnica de microscopía confocal y microscopía electrónica, sugiriendo que esta relocalización se debe principalmente a la expansión de la vacuola y que es regulada por ABA.

### 6.3.2 Algunos parámetros fisiológicos de la respuesta a ABA

#### Tasa fotosintética

Se exploró el efecto de distintas concentraciones de ABA exógeno en la asimilación de CO<sub>2</sub> a partir de la cual se estimó la actividad fotosintética y se evaluó la tasa fotosintética en talos tratados con ABA y tratados posteriormente con NaCl 150 mM (Figura 6.9).



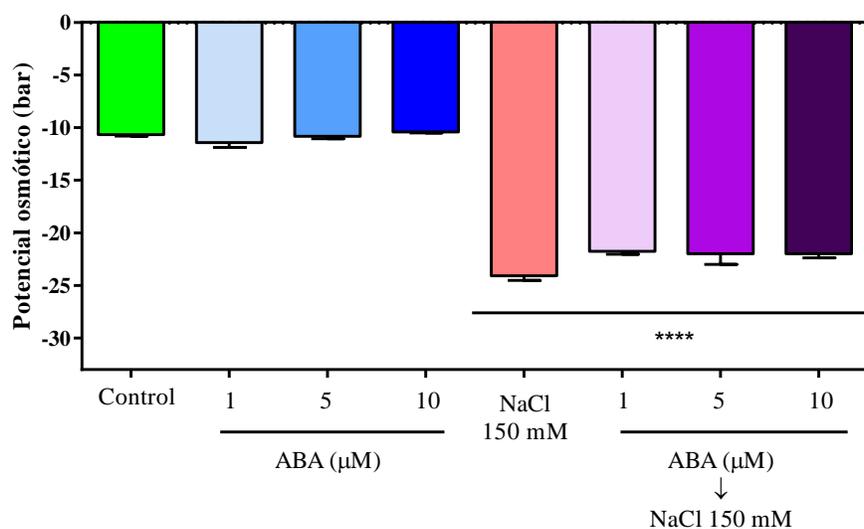
**Figura 6.9 Tasa fotosintética neta ( $\mu\text{mol CO}_2 * \text{g}^{-1} * \text{s}^{-1}$ ) evaluada en talos tratados con ABA y pretratados con ABA y posteriormente expuestos a NaCl 150 mM.** (A) Tasa fotosintética de los talos expuestos a tres concentraciones de ABA durante 24 h. (B) Tasa fotosintética de talos expuestos a tres concentraciones de ABA y transferidos posteriormente a medio con NaCl 150 mM. Los valores en “y” > 0 indican fotosíntesis activa; los valores en “y” < 0 indican fotosíntesis inactiva. Las barras indican error estándar, sin embargo, los grupos no son cuantitativamente comparables. Cada réplica se compone de 80 a 100 talos, cada punto corresponde a tres réplicas. Los esquemas indican el intercambio de gases en cada zona de la gráfica: a, consumo de CO<sub>2</sub> de talos sobre filtro húmedo; b, filtro hidratado sin plantas.

En este experimento se encontró que la tasa fotosintética no fue afectada por el tratamiento con tres diferentes concentraciones de ABA exógeno (Figura 6.9 A). Por otro lado, los talos pretratados con ABA y posteriormente tratados con NaCl 150 mM, fueron capaces de efectuar fotosíntesis (Figura 6.9 B). Los resultados observados en la figura 6.9 B no son distintos de los observado en los tratamientos individuales con ABA o sólo con NaCl 150 mM. Como se describió anteriormente, la exposición de talos a NaCl 150 mM no afectó

la asimilación de CO<sub>2</sub>, sin embargo, tratamientos con mayores concentraciones de NaCl si lo hicieron (Figura 6.3). Ya que se buscaba observar un efecto de protección mediante el pretratamiento con ABA, no fue posible dilucidar si esto ocurre debido a que la exposición a NaCl 150 mM no tiene un efecto en la asimilación de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, este experimento confirma que el tratamiento con ABA 1, 5 y 10 μ y la posterior exposición a 150 mM de NaCl no inactiva la fotosíntesis.

#### Evaluación del potencial osmótico

Por otro lado, se analizó si el tratamiento con ABA exógeno afecta la acumulación de osmolitos, ya que se observó esta respuesta ante la exposición a NaCl de manera consistente con lo que se ha observado en plantas vasculares. Esta observación podría permitirnos inferir si la acumulación de osmolitos observada durante estrés y converge con la acumulación de osmolitos debido a la presencia de ABA, es decir, es un evento común de estos dos estímulos. Se encontró que el ABA exógeno no afecta el potencial osmótico a diferencia de lo observado durante el tratamiento con las tres concentraciones de NaCl (Figura 6.10).



**Figura 6.10 Potencial osmótico en talos tratados con diferentes concentraciones de ABA y posteriormente expuestos a NaCl 150 mM.** La gráfica indica que el tratamiento de los talos con diferentes concentraciones de ABA no afectó su potencial osmótico, sin embargo, se observó una disminución significativa del potencial osmótico en los talos pretratados con diferentes concentraciones de ABA y expuestos posteriormente a NaCl 150 mM. Las barras indican el error estándar de tres réplicas independientes. La grafica

se construyó con datos de tres réplicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía  $F(7,16) = 182.1$  y comparaciones entre grupos con la prueba de Tukey encontrando diferencia significativa del tratamiento con NaCl 150 mM respecto al grupo control, además del pretratamiento con ABA (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y posterior exposición a NaCl respecto al grupo control: \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ . Sin embargo, la prueba de ANOVA de una vía no encontró diferencia significativa al comparar el grupo control con ABA (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ )  $F(3,8) = 2.6$ ,  $p = 0.1245$ , y tampoco se encontró diferencia al comparar el tratamiento con NaCl 150 mM respecto a los talos pretratados con ABA y tratados posteriormente con NaCl 150 mM  $F(3,8) = 3.288$ ,  $p = 0.0791$ .

Además, el tratamiento con NaCl 150 mM disminuyó el potencial osmótico de los talos de este grupo experimental (Figura 6.10), a pesar de que en el grupo experimental anterior (Figura 6.4), no hubo efecto sobre el potencial osmótico en los talos tratados con esta concentración de NaCl. Esta inconsistencia se debe probablemente a un error del experimentador ya que experimentos independientes corroboran que el tratamiento de talos con NaCl 150 mM induce la disminución del potencial osmótico esto se discutirá más adelante.

Tomando como referencia el efecto de la exposición a NaCl 150 mM en el potencial osmótico se exploró si el pretratamiento de los talos con diferentes concentraciones de ABA tenía un efecto de protección al exponer posteriormente los talos a esta condición de estrés salino. Los resultados indicaron que el pretratamiento con cualquiera de las concentraciones de ABA no protegió a los talos ante la posterior exposición a NaCl 150 mM ya que se observó en los tres grupos el mismo efecto que en la muestra tratada únicamente con NaCl 150 mM de este grupo experimental (Figura 6.10).

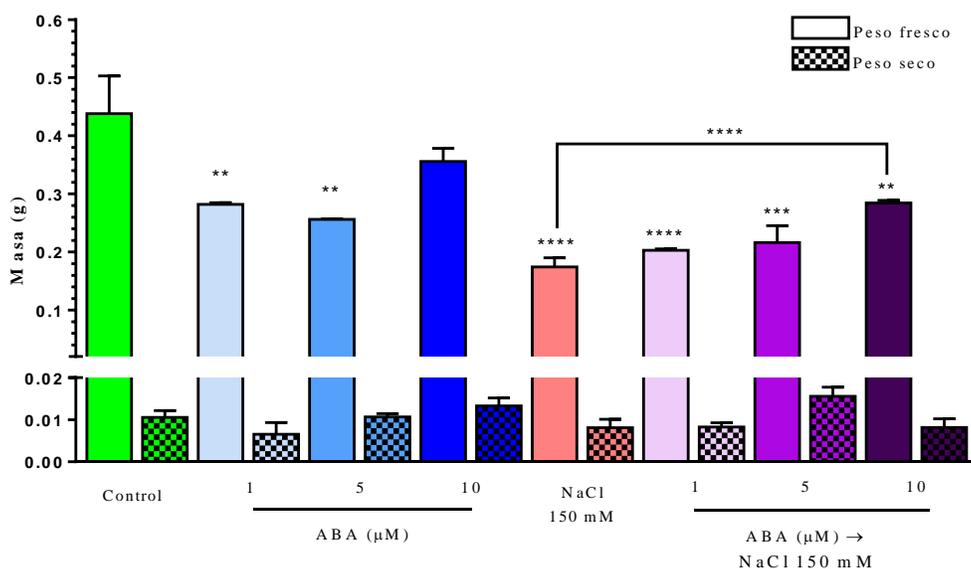
No se presentó un incremento significativo en el potencial osmótico de los talos expuestos a las tres concentraciones de ABA respecto al control, y ninguna de las tres concentraciones de ABA evitó el efecto del tratamiento con NaCl 150 mM sobre el potencial osmótico. A continuación, se exploró el efecto de estos tratamientos en el peso fresco y en el peso seco de los talos.

#### Evaluación del peso fresco y peso seco

Se evaluó el peso fresco y el peso seco en los talos expuestos a las tres concentraciones analizadas de ABA. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el peso seco

de ningún grupo comparado con otro. Esto permite inferir que el tratamiento con ABA no afecta la acumulación de biomasa en este corto periodo de tiempo (Figura 6.11).

Por otro lado, al comparar el peso fresco de los talos tratados con ABA 1 y 5  $\mu\text{M}$  respecto a control, se encontró que la masa disminuye significativamente un 64% y un 58 % respectivamente. Este resultado es poco esperado debido a que en estos tratamientos no se encontró una disminución del potencial osmótico. Este panorama plantearía que los talos pierden agua, pero el potencial osmótico se mantiene similar al control. Además, el tratamiento con mayor concentración de ABA (10 $\mu\text{M}$ ) no presenta diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, lo cual sería esperado ya que una mayor concentración generaría un efecto mayor. La única manera de explicar este fenómeno es que el tratamiento con ABA induzca la pérdida de agua, pero a su vez compense la osmolaridad celular, lo cual es difícil de explicar.



**Figura 6.11 Evaluación del peso fresco y peso seco en los talos tratados con diferentes concentraciones de ABA y en los talos tratados con ABA expuestos posteriormente a NaCl 150 mM.** La grafica indica que el tratamiento con diferentes concentraciones de ABA no afecta el peso seco; sin embargo, el tratamiento con 1 y 5  $\mu\text{M}$  de ABA si afecta el peso fresco. Por otro lado, en los talos pretratados con diferentes concentraciones de ABA y expuestos posteriormente a NaCl 150 mM, se encontró que el peso seco no se ve afectado, pero si disminuye el peso fresco respecto al grupo control, de manera similar al efecto del tratamiento únicamente con NaCl 150 mM. Las barras indican el error estándar de tres replicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía  $F(7,16) = 10.11$  y comparaciones entre grupos con la prueba de Tukey. Los

talos tratados con NaCl 150 mM pierden agua significativamente respecto a control: \*\*\*\*= $p \leq 0.0001$ , así como los talos tratados con ABA (1 y 5  $\mu\text{M}$ ), y los pretratados con ABA (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) y posteriormente con NaCl 150 mM: \*\*\*\*= $p = 0.0001$ -0.001\*\* =  $p = 0.001 - 0.01$ . La comparación entre el tratamiento con NaCl 150mM y el pretratamiento con ABA 10  $\mu\text{M}$  y exposición a NaCl resulto significativa: \*\*\*\*= $p \leq 0.0001$ . En cuanto al peso seco evaluado, la prueba de ANOVA de una vía F (7, 16) = 2.862  $p = 0.0386$  indicó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

En el experimento de pretratamiento con diferentes concentraciones de ABA y exposición posterior a NaCl 150 mM, se observó que el peso seco no cambió, pero el peso fresco si disminuyó significativamente respecto al grupo control. Es decir, los talos pretratados con diferentes concentraciones de ABA y tratados posteriormente con NaCl 150 mM se comportan de manera similar al grupo tratado únicamente con NaCl 150 mM, lo que sugiere que no hay un efecto de protección de los tratamientos con ABA 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Al comparar el peso fresco entre los talos pretratados con diferentes concentraciones de ABA y expuestos posteriormente a NaCl 150 mM y los talos tratados únicamente con NaCl 150 mM, se observó que el pretratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de ABA difiere significativamente del grupo tratado únicamente con 150 mM. Esto sugiere que el pretratamiento con ABA 10 mM pudiera proteger parcialmente al talo de la pérdida de agua durante la exposición a NaCl 150 mM.

Con base en los resultados descritos, se concluye que el pretratamiento con ABA (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ): 1) Evita la clorosis y posible oxidación y pérdida de turgencia en la zona central de los talos expuestos a 150 mM de NaCl, aunque los efectos de causados por esta concentración de NaCl son discretos. 2) Induce la relocalización de cloroplastos hacia la periferia celular. 3) No afecta el potencial osmótico ni evita la disminución de este por la exposición posterior a NaCl. 4) Podría afectar el contenido de agua en los talos por algún mecanismo que no está claro.

#### **6.4 Análisis de la respuesta mediada por miRNAs durante estrés salino**

Hasta este momento, se han presentado las respuestas morfológicas y fisiológicas al tratamiento con NaCl 150, 250 y 500 mM, sin embargo, la respuesta al estrés mediada por miRNAs esta englobada dentro de las respuestas moleculares. Por esto, se evaluó la acumulación del mRNA del *LEA7*, con el fin de corroborar si los tratamientos con NaCl

probados inducen la acumulación de un marcador molecular de la respuesta a estrés en *M. polymorpha*.

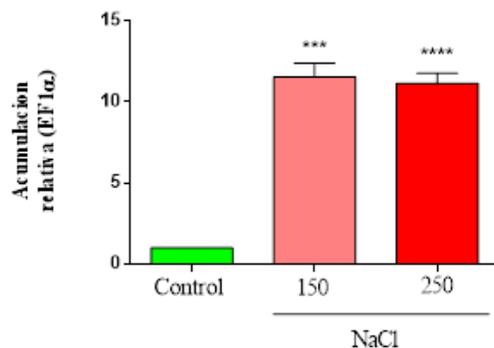
Cabe aclarar que los análisis de cuantificación de la abundancia de un miRNA o mRNA que se describirán a partir de aquí se refieren al término “acumulación” cuando se habla de qPCR y al término “expresión” cuando se habla de secuenciación. En ambos casos, se evalúa la acumulación de la población de una especie de RNA en todos los tejidos en un momento dado. Esta depende de la homeóstasis entre su tasa de síntesis y su tasa de degradación, pero no se está evaluando como tal la tasa expresión o síntesis. Sin embargo, la acumulación de las moléculas sí está fuertemente relacionada con su expresión, por lo que se mantuvo esta palabra *heredada* de la literatura al hablar de los datos de secuenciación.

#### 6.4.1 Acumulación del mRNA de la MpLEA 7

Las proteínas LEA son abundantes durante la embriogénesis tardía y se ha documentado su prevalencia en tejido vegetativo en respuesta a estrés osmótico, en plantas vasculares y no vasculares (Akter *et al.*, 2014; Bhardwaj *et al.*, 2013). Estas proteínas se caracterizan por ser intrínsecamente desordenadas, y por esta característica se ha propuesto que ejercen su función participando como un sistema de respuesta ante los efectos de la sequía y la salinidad (Battaglia y Covarrubias, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2013; Cuevas-Velazquez *et al.*, 2017)

En briofitas, se ha descrito que se acumulan proteínas LEA en respuesta a estrés abiótico como deshidratación y frío y en respuesta a la fitohormona ABA (Akter *et al.*, 2014; Godínez-Vidal *et al.*, 2020). Godínez-Vidal *et al.* (2020), encontró que los mRNAs reportados como homólogos de las *LEA7* (Mapoly0025s0039 genoma de *M. polymorpha* v 3.1, Phytozome) y *LEA5* (Mapoly0087s0015 genoma de *M. polymorpha* v 3.1, Phytozome), se acumulan en gemas y talos expuestos a estrés hídrico por deshidratación, salinidad y ABA. De esta manera, se procedió a evaluar la acumulación relativa del mRNA la *LEA7* para confirmar que los tratamientos probados indujeran la acumulación de este marcador de estrés.

La cuantificación de la acumulación relativa del mRNA de la *LEA7* se llevó a cabo mediante RT-qPCR en los talos expuestos a medio salino (Figura 6.6).



**Figura 6.12 Acumulación relativa del mRNA del MpLEA7 en talos expuestos a diferentes concentraciones de NaCl.** La acumulación normalizada al mRNA del factor MpEF1 $\alpha$ , se representó relativa a la acumulación de este mRNA en talos control, establecida como 1. Las barras indican el error estándar de dos replicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía F (2,5) = 38.91 y comparaciones entre grupos con la prueba de Tukey encontrando un aumento significativo en la acumulación del mRNA de la MpLEA7 en los talos tratados con NaCl 150 y 250 mM respecto al grupo control: \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\*\* =  $p = 0.0001-0.001$ .

El mRNA de la MpLEA7 se acumula significativamente en talos expuestos a medio salino. El mRNA de la LEA7 incrementó su acumulación al menos 10 veces más en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM, respecto a su acumulación en talos control (Figura 6.12). El RNA extraído de estos grupos experimentales se empleó más adelante para llevar a cabo la secuenciación masiva de RNAs pequeños (ver sección 5.6).

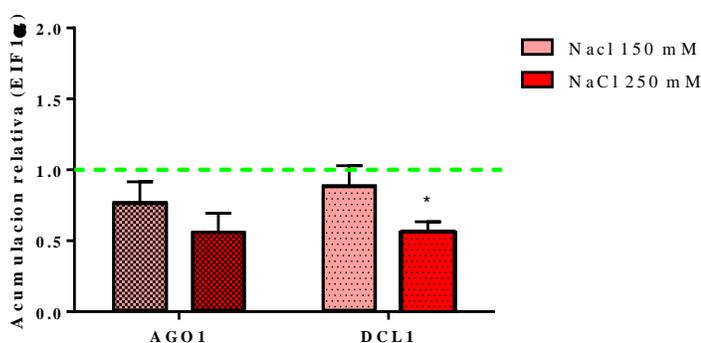
#### 6.4.2 Acumulación relativa de los transcritos de DCL1 y AGO1 en respuesta a estrés salino

La vía de regulación mediada por miRNAs se conforma de múltiples niveles y son diversos los factores que afectan la acumulación de los miRNAs y de sus mRNAs blanco además de la regulación mediada por el propio miRNA. DCL1 (Mapoly0003s0222 *M. polymorpha* v 3.1, Phytozome) participa durante la biogénesis de miRNAs y AGO1 (Mapoly0001s0149 *M. polymorpha* v 3.1, Phytozome) es la enzima núcleo del complejo RISC mediante el cual los miRNAs dirigen la degradación de sus mRNAs blanco.

Como parte del estudio de la respuesta a estrés abiótico mediada por miRNAs se analizó si existía un cambio en la acumulación de los mRNAs de AGO1 y DCL1, como

enzimas núcleo de la biogénesis y actividad de los miRNAs. Esto resulta interesante debido a que, si el estrés afecta la acumulación de los mRNAs de estas enzimas su síntesis pudiera verse afectada, lo cual afectaría de manera global la acumulación y actividad de los miRNAs. En la literatura existen reportes que indican que los mRNAs de *AGO* y *DCL*, se acumulan diferencialmente en respuesta a estrés abiótico en algunas especies vegetales, donde se observó un incremento en su acumulación (Capitão *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2018).

Se evaluó la acumulación relativa del mRNA de la DCL1 y de la AGO1 en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM durante 24 h y en el grupo control. Se usaron los métodos de cuantificación de mRNAs por RT-qPCR basado en SYBR Green y análisis por el método de  $\Delta\Delta CT$  descritos en las secciones anteriores. Como se ilustra en la figura 6.13, no se presentó un cambio significativo en la acumulación del mRNA de la AGO1 en talos tratados con NaCl 150 o 250 mM, así mismo, la acumulación relativa del mRNA de la DCL1 no disminuye significativamente en talos tratados con NaCl 150 mM; sin embargo, si observó un decremento estadísticamente significativo en la acumulación del mRNA de la DCL en los talos expuestos a NaCl 250 mM, lo cual contradice las observaciones previas que registraron incremento del mRNA de DCL1 en respuesta a estrés hídrico.



**Figura 6.13 Acumulación relativa del mRNA del MpAGO1 y del mRNA del MpDCL1 en talos expuestos a NaCl.** La acumulación normalizada al mRNA del factor MpEF1 $\alpha$ , se representó relativa a la acumulación de cada mRNA en los talos control, establecida como 1 (línea punteada). Las barras de error corresponden al error estándar de tres réplicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA y comparaciones entre los tratamientos con la prueba de Tukey para cada mRNA. No se encontró una diferencia significativa para la acumulación del mRNA del MpAGO1:  $F(2,6) = 3.711$   $p = 0.0371$ . Se encontró una

diferencia significativa en la acumulación del mRNA del MpDCL1:  $F(2,6) = 5.997$  en talos expuestos a NaCl 250 mM: \*  $p \leq 0.05$  pero no a 150 mM.

La acumulación de los mRNAs de AGO1 y DCL1 responde a estrés hídrico en tres especies, *M. truncatula*, *Capsicum annuum*, y *Saccharum spontaneum*, (Capitão *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2018), en todos los casos se encontró que la acumulación del mRNA de AGO1 y/o DCL1 se incrementó en respuesta al estrés. En el caso de *M. truncatula*, se analizaron plantas de 8 semanas de edad, y el incremento en los mRNAs de MtAGO1 y MtDCL1 en respuesta a sequía se registró principalmente en los tejidos de la raíz. El análisis de *C. annuum* se realizó en plantas de 8 semanas y se registró el aumento en la expresión de AGO1 y DCL1 principalmente en tallos y hojas, en respuesta a frío, deshidratación y presencia de NaCl en el medio. En el caso de *S. spontaneum*, se encontró que no posee el homólogo de AGO1 y se desconoce que gen reemplaza esta función, sin embargo, está presente DCL1 y aumenta su acumulación en respuesta a deshidratación, los cambios se encontraron en tallos y hojas de plantas de cuatro semanas de edad. En este proyecto, se encontró que el mRNA de AGO1 no cambia en las condiciones experimentadas y la acumulación de DCL1 disminuye únicamente en talos expuestos a NaCl 250 mM. La disminución de la acumulación del mRNA de DCL1 puede responder a la disminución de distintos procesos que pueden no ser estrictamente necesarios para sobrevivir durante el estrés severo, además, es necesario considerar que existe una población de miRNAs acumulada, que puede continuar activa a través de la AGO1.

Estos resultados sugieren que no existe una regulación global de los miRNAs a través del cambio en la acumulación del mRNA de DCL1 y/o AGO1 en la etapa de desarrollo estudiada, aunque cabría analizar si tiene algún efecto el pequeño cambio encontrado en la acumulación del mRNA de la DCL1 en los talos tratados con NaCl 250 mM. Por lo tanto, es necesario explorar el efecto de la salinidad en la población de los miRNAs maduros en los talos tratados con las dos concentraciones de NaCl. Para identificar los miRNAs que se acumulan diferencialmente en respuesta a las concentraciones de NaCl analizadas se llevó a cabo la secuenciación masiva de RNAs pequeños en talos expuestos a estrés salino.

### 6.4.3 Identificación de miRNAs mediante secuenciación masiva

La secuenciación masiva de especies pequeñas de RNA se llevó a cabo en muestras tratadas con NaCl 150 o 250 mM y en condiciones control. Para las 6 bibliotecas se analizaron los siguientes parámetros de calidad: perfil de poblaciones de especies pequeñas de RNAs con una distribución cercana a la normal entre los 18 a los 30 nucleótidos y puntaje de calidad de Fred mayor a 28 hasta la posición 30, ya que este parámetro de calidad cubre el tamaño de interés. También se obtuvo un contenido de GC por lectura cercano al esperado. El contenido bases no asignadas (N) que fue del 0%, lo cual es lo adecuado. La principal consideración a este grupo de datos es el tamaño, ya que el número de lecturas obtenido fue de únicamente el 10% esperado para un experimento de secuenciación de este tipo. A pesar de esta limitante los datos obtenidos pueden reflejar los mayores cambios en respuesta a estrés y tal vez no los eventos de regulación fina. Estos datos aun así son novedosos y nos permitieron seguir adelante con el proyecto.

El análisis de componentes principales mostró de forma inesperada que las muestras control se agruparon con las muestras de NaCl 150 mM (comunicación personal de M. C. Verónica Jiménez, UUSMB). Se esperaba que las muestras tratadas con NaCl 150 o 250 mM se agruparan entre sí y se separaran de las muestras no tratadas. Esto puede deberse a un artefacto técnico (sesgo por el bajo número de lecturas) o a que las muestras tratadas con NaCl tienen mayor diferencia entre sí que con el control, implicando que la respuesta a cada condición de estrés es distinta. Esto es consistente con los experimentos fisiológicos que nos mostraron que los tratamientos con NaCl 250 o 500 mM son condiciones de estrés severo con efecto distinto al observado con NaCl 150 mM.

La base de datos de miRNAs recibida de la UUSMB agrupa la información de expresión diferencial de tres grupos (Control, tratamiento con NaCl 150 mM y tratamiento con NaCl 250 Mm) con dos réplicas independientes. Además, el análisis de expresión diferencial se hizo por pares, comparando el grupo control respecto a cada tratamiento por separado, y esto se realizó para cada réplica independiente. De esta forma, la base de datos recibida contenía cuatro grupos: Análisis del grupo control vs tratamiento con NaCl 150 mM repetición 1 y 2, análisis del grupo control vs tratamiento con NaCl 250 mM repetición 1 y 2.

Debido a que la secuenciación se anotó con un set de secuencias que el grupo de Arteaga-Vázquez propuso como miRNAs de manera preliminar (datos no publicados), y con la base de datos miRBase (ya que no se contaba con el genoma de *M. polymorpha* en ese momento), se decidió conservar en la base de datos únicamente los miRNAs confirmados en *M. polymorpha* por otros autores (Pin-Chun Lin *et al.*, 2016 y Tsuzuki *et al.*, 2016). Al primer grupo se les llamo *posibles miRNAs*, al segundo grupo se le llamo *miRNAs identificados previamente en M. polymorpha*. Para cada miRNA se promediaron las lecturas normalizadas (*size factor*) reportadas en cada replica independiente y se redondeó a enteros este valor. Se consideró que un miRNA se expresa con una sola lectura en esta base de datos. Con estas consideraciones se obtuvieron las tablas 6.1 y 6.2. En total se encontraron 60 miRNAs en el conjunto de tres tratamientos con dos replicas independientes (Tabla 6.2).

**Tabla 6.1 Numero de secuencias y miRNAs encontrados mediante secuenciación en cada réplica independiente**

	Réplica 1			Réplica 2		
	Tratamiento con NaCl (mM)			Tratamiento con NaCl (mM)		
	Control	150	250	Control	150	250
Lecturas crudas	1 055 904	996 833	2 173 122	1 749 091	1 397 782	1 000 769
Total de lecturas que corresponden a posibles miRNAs <sup>A</sup>	11 706	2 212	163	5 1645	9 373	4 839
Total de lecturas normalizadas <sup>B</sup> de posibles miRNAs	<u>vs 150:</u> 15616	8 874	2 155	<u>vs 150:</u> 10838	7 579	4 497
	<u>vs 250:</u> 6508			<u>vs 250:</u> 6675		
No. de posibles miRNAs identificados	93	76	37	116	105	100
Total de lecturas asignadas a un miRNA identificado previamente en <i>M. polymorpha</i> <sup>C</sup>	<u>vs 150:</u> 10643	8675	1639	<u>vs 150:</u> 6772	6176	3936
	<u>vs 250:</u> 4435			5343		

Nota: **A.** Para identificar las lecturas que corresponden a miRNAs se usó como medio de anotación por comparación, la base de datos proporcionada por Arteaga *et al.* (datos no publicados) y miRBase; **B.** Lecturas normalizadas al tamaño de las bibliotecas comparadas (*size factor*) que corresponden por un miRNA identificado por Arteaga-Vazquez *et al.* (datos no publicados); **C.** Se contaron únicamente las lecturas que corresponden a secuencias de miRNAs que también fueron identificadas por Pin-Chun Lin *et al.*, 2016 y por Tsuzuki *et al.*, 2016. A partir de que se empezaron a considerar las lecturas normalizadas, se presentan dos datos para el grupo control identificado como *vs150* o *vs250* para indicar que el dato presentado corresponde al análisis pareado entre la biblioteca control y la de talos tratados con NaCl 150 o 250 mM respectivamente.

**Tabla 6.2 Número de miRNAs identificados en cada análisis pareado**

	<b>Control</b>	<b>Tratamiento con NaCl 150 mM</b>	<b>Control</b>	<b>Tratamiento con NaCl 250 mM</b>
Número de miRNAs por grupo	59	56	56	50
Conjunto del total de miRNAs identificados	<b>60</b>			

Nota: Los valores presentados se obtuvieron tras calcular el promedio de las lecturas normalizadas entre cada réplica independiente, y redondear estos valores, obteniendo así el número de lecturas en cada grupo. Posteriormente se contaron los miRNAs con al menos una lectura en cada análisis pareado, obteniendo así el número de mi RNAs en cada grupo.

Del análisis de expresión diferencial, se retomó el FC, el *p-value* de la prueba estadística de este análisis, y el número de lecturas, datos presentados en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3 miRNAs de *M. polymorpha* identificados por secuenciación masiva y su acumulación durante estrés salino (parte 1)**

No.	Nombre del miRNA	Secuencia (5'-3')	Tratamiento con NaCl (mM)					
			150			250		
			FC	<i>p-value</i>	L	FC	<i>pval</i>	L
1	MpmiR166a	TTCGGACCAGGCTTCATTCCC	1.80	0.425	3684	2.75	0.633	1233
2	MpmiR319a	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC	0.77	0.758	136	0.88	0.742	57
3	MpmiR11666.1	TCGTAGAACGATGCTAGACC	1.42	0.958	206	1.56	1.000	94
4	MpmiR11669.2	TGATCTGGAATCGTGGAAGAA	1.36	0.744	237	0.56	0.188	272
5	MpmiR11670.5/.1	CTGTCAAGCTGGAGAAAACCC	1.37	0.725	32	1.95	1.000	12
6	MpmiR11671.1	TGAAAAGTGGGATGGAGATCC	0.80	0.675	78	1.06	0.488	28
7	MpmiR11672.1	TCTGGTCTGCTTTATGGCCT	1.10	1.000	223	0.67	0.324	202
8	MpmiR11677	TCCCGTGAGTGTTCCAGCTG	1.04	1.000	168	0.95	0.469	103
9	MpmiR11679.1	TAACGTCTTCAGAAAGGAGTC	0.55	0.703	22	0.72	0.890	9
10	MpmiR11681.2	CTCCTTTGCTTCTACAAGCTA	0.58	0.519	13	0.84	0.272	5
11	MpmiR11684	TATTATGCTTCCTACATCGTG	1.24	1.000	4	5.22	0.595	0
12	MpmiR11693a/c	CTTTGGCAGCCAAAAGGAGGAC	1.58	0.689	137	1.05	0.427	113
13	MpmiR11676.2	TCATCCAGGATGATCAAGAC	0.61	0.384	72	1.14	0.433	21
14	MpmiR11685.2	CTGTAAGCAGATTACTCGAC	3.32	0.274	5	6.64	0.516	1
15	MpmiR11698.5	TCGTCATTTCGGGCTGCGAAGA	1.98	0.479	2	Inf	0.571	0
16	MpmiR11703c	TAACCTGGAACCTTGGGAAGAAG	0.80	0.597	4	0.68	0.337	3
17	MpmiR11715b	ATCACTGTTCCTTGCACCGTC	1.95	0.535	170	3.84	0.380	39
18	MpmiR11727	ACTGGATGTGCGGGGATCTGA	3.35	0.279	14	0.85	0.814	25
19	MpmiR11730	AGAGAATCGAAGTGGAACGCC	1.47	0.751	10	0.23	1.000	29
20	MpmiR11731	TGTCAAGCTTTCGGATGTCACC	0.60	1.000	455	1.01	0.692	123
21	MpmiR11732	GTGCTTGACTGCAAGATGGGC	11.35	0.067	2	1.18	0.456	8
22	MpmiR11734	AGAGGAAACGCAACAGCATCC	0.65	0.562	92	0.32	0.440	91
23	MpmiR11735	AAGGACAAGGCCACTGACAAG	0.66	0.555	39	0.88	0.764	15
24	MpmiR11737a	TCCGTGGAAGAAGACAATCTG	1.68	1.000	10	2.18	1.000	4
25	MpmiR11737b	TCCATGGAAGAAGACAATATG	0.72	0.689	10	2.08	0.590	2
26	MpmiR11739	TAGGAGGTAGAAGATGCCAGG	0.59	0.498	29	0.43	0.886	19
27	MpmiR11742a	CGGACTCCAGTTGGCATGTGC	0.23	0.049	37	0.15	0.530	27

**Tabla 6.3 miRNAs de *M. polymorpha* identificados por secuenciación masiva y su acumulación durante estrés salino (parte 2)**

No.	Nombre del miRNA	Secuencia (5'-3')	Tratamiento con NaCl (mM)					
			150			250		
			FC	<i>p-value</i>	L	FC	<i>pval</i>	L
28	MpmiR11742b	CGGACCTCAGTTGGCATGTGC	0.26	0.146	9	0.08	0.803	16
29	MpmiR11745	CGGATCATGTGGAGACTCACC	0.23	0.864	16	0.24	1.000	8
30	MpmiR11747a	TCAATGGTAAACCCCTAGCTG	1.28	0.963	14	2.14	1.000	4
31	MpmiR11747b	TCAATGGTAAACCCCTAGCTC	1.62	0.897	1	0.68	0.214	1
32	MpmiR11749	TCAGAGAGAAGAGATGGGACGA	0.69	0.296	10	2.63	0.724	1
33	MpmiR11750	TTTGATTGTCCACCTTATGCTT	1.05	0.807	35	1.28	0.724	15
34	MpmiR11752	TTCCACCCAGATCGATGCGGGAC	1.16	0.435	17	3.26	1.000	3
35	MpmiR11753	TCTCGCGAATCGGATGGAAGGA	0.95	0.400	1	Inf	0.985	0
36	MpmiR11754	ATGACCAGGATTTTCATTGAACAGG	0.82	0.619	14	2.13	1.000	3
37	MpmiR11756	TCAAAGTCAAAAATCATCGAC	0.95	0.597	121	0.80	1.000	80
38	MpmiR11757	TGTGTTAATCAATTGGGGTCC	1.68	1.000	8	0.96	0.620	6
39	MpmiR11758	CAGGCCATAGTCGGCATGTGC	0.16	0.700	10	0.15	0.323	7
40	MpmiR11767	ATCATAAGAGATGGTGAGGAT	Inf	0.770	0	-	-	-
41	MpmiR11768a	TTGCCAAGCTTGCTAGTGCC	2.02	0.603	110	3.07	0.869	31
42	MpmiR11770	TCCATTGTTTCAGCAAGATTCG	0.73	1.000	17	1.56	0.606	5
43	MpmiR11771	CTCAAAATCCACGTTGTCAAG	0.19	0.453	5	0.51	1.000	1
44	MpmiR11772	CATGTTTAGAGAGAAAGAGAG	0.81	0.627	4	1.94	1.000	1
45	MpmiR11775b	GACAACCTAGATCCATTGGAAG	1.31	0.573	2	1.31	0.671	1
46	MpmiR11775d	GATAACTGAAGGCATTGCAAG	0.26	0.383	1	-	-	-
47	MpmiR11779	TCGTGGCTGACATAATCAACA	1.57	0.509	7	Inf	0.144	0
48	MpmiR11780	CTCCCATACTCAGCTATCGGC	0.44	0.806	8	2.01	1.000	1
49	MpmiR11781	TCACAGTACTCTGATGACATG	0.44	0.446	17	1.57	1.000	3
50	MpmiR11782	TCTAGAGTGCAGTCTTCATTC	0.54	1.000	50	1.60	0.573	9
51	MpmiR11785	TTTCTCTGAATCTTCTCATCA	0.70	1.000	12	0.93	0.407	5

**Tabla 6.3 miRNAs de *M. polymorpha* identificados por secuenciación masiva y su acumulación durante estrés salino (parte 3)**

No.	Nombre del miRNA	Secuencia (5'-3')	Tratamiento con NaCl (mM)					
			150			250		
			FC	<i>p-value</i>	L	FC	<i>pval</i>	L
52	MpmiR11788	TCGCAAGTTCGACAGGTTGCC	0.34	0.915	8	0.19	0.948	8
53	MpmiR11794	TGTCACACTTGCAATGAGAGC	0.75	0.737	6	2.66	0.447	1
54	MpmiR11800	TTCCATGAGGTCCTTGAAGGC	0.39	1.000	2	0.42	0.263	1
55	MpmiR11805	CAGACCTAGAATATGATGCAC	1.26	0.730	66	1.34	0.652	32
56	MpmiR11815	TGAACAGACATATTGAAGAGGC	Inf	0.491	0	1.75	1.000	0
57	MpmiR11823	CGCAGAATTTGGTACGAGGAG	0.90	1.000	4	3.46	0.946	0
58	MpmiR11882	TCTTATGCTTCCAGACTTTGA	1.22	0.688	2	1.30	1.000	1
59	MpmiR11884	TGTTTGCTGATTTTACATCTC	1.650	0.758	0	-	-	-
60	MpmiR11835	ATTTAGATGTGTGTTTCAGGC	Inf	0.618	0	Inf	1	0

**Nota:** El análisis de expresión diferencial reporta las veces de cambio o FC, el estadístico de significancia *p-value* y L, número de lecturas que corresponde al promedio entre las dos réplicas experimentales, de lecturas normalizadas. En la tabla, los valores >1.1 indican una disminución en la acumulación del miRNA en los talos tratados respecto a talos control (verde), valores <0.9 indican un aumento en la acumulación relativa en talos tratados respecto a control (rojo). Los miRNAs con veces de cambio igual a 1±0.1 en salinidad se consideran sin cambio respecto a control (amarillo). Inf expresa que en el tratamiento con NaCl las lecturas fueron cero y sólo se obtuvieron lecturas en la condición control.

El valor de FC (veces de cambio) reportado indica:  $\frac{control}{tratamiento} < 0.9$  = incremento en el tratamiento respecto a control (rojo);  $\frac{control}{tratamiento} > 1.1$  disminución en el tratamiento respecto a control (verde). Para expresarlo en términos de cambio en el tratamiento (respecto a control), calculamos el recíproco de los valores obtenidos reportados en el análisis, es decir  $\frac{1}{FC\ reportado}$ . De acuerdo con esto, en la biblioteca de talos tratados con NaCl 150 mM se identificaron 28 miRNAs cuya acumulación se incrementó, 26 miRNAs cuya acumulación disminuyó y 6 miRNAs cuya acumulación no cambió respecto a control. En la biblioteca de talos tratados con NaCl 250 mM se encontró que la acumulación de 20 miRNAs aumentó, la de 34 disminuyó y la de 6 miRNAs no cambió respecto a control. Se identificaron 14 miRNAs que aumentaron en ambos tratamientos, 18 miRNAs que bajaron en ambos tratamientos y un miRNA que no cambió en ninguno de los dos tratamientos respecto a control, de acuerdo con los parámetros establecidos. Los restantes 27 miRNAs se acumularon de manera dispar entre ambos tratamientos. El tamaño de la muestra de la que se partió no permitió obtener un análisis estadístico confiable por lo que la estadística asociada al análisis de expresión diferencial resultó significativa ( $p < 0.05$ ) únicamente para el miR166a ( $p = 0.049$ ) en el análisis de talos tratados con NaCl 150 mM vs Control, y en este análisis también la estadística del FC del miR319 está muy cerca de ser significativo ( $p = 0.067$ ). En la comparación entre NaCl 250 mM vs Control, ningún análisis estadístico sobre los valores de FC resultó significativo.

De los 60 miRNAs identificados, únicamente dos son miRNAs conservados en el linaje de las plantas terrestres: MpmiR166, y MpmiR319. De acuerdo con el análisis de secuenciación masiva, el FC del miR166 fue 1.8 por lo que disminuyó en 0.56 veces en los talos expuestos a NaCl 150 mM y el FC en los talos tratados con NaCl 250 mM fue 2.75 por lo que miR166 disminuyó en 0.36 veces. Por otro lado, el valor de FC del MpmiR319 reportado en talos expuestos a NaCl 150 mM fue 0.77 por lo que MpmiR319 aumentó 1.3 veces, y se reportó un FC = 0.88 en talos expuestos a NaCl 250 mM lo que implica un aumento de 1.14 veces respecto a su acumulación en talos control.

Manteniendo en mente que las pruebas estadísticas sobre el FC indicaron que hay una baja posibilidad de que fuera real, la lista de 60 miRNAs encontrada es valiosa ya que es un grupo de miRNAs que se expresó en los talos analizados, y al ser un grupo reducido,

constituyen un interesante punto de partida para acercarnos a la participación de los miRNAs en la respuesta a NaCl en *M. polymorpha*.

#### 6.4.4 Comprobación de algunos miRNAs por RT-qPCR

Para corroborar la acumulación de los microRNAs identificados en respuesta a NaCl mediante una estrategia puntual y no masiva, se analizó la acumulación relativa de algunos miRNAs mediante RT-qPCR. De los 60 miRNAs identificados por secuenciación masiva en *M. polymorpha* (Tabla 6.3) se seleccionaron tres miRNAs conservados en las plantas terrestres, dos de los miRNAs que fueron detectados por secuenciación (MpmiR166 y MpmiR319) y uno que no fue detectado en este experimento de secuenciación (MpmiR529), pero que se identificó previamente en *M. polymorpha* (Tsuzuki *et al.*, 2016). Fue de interés incluir a este miRNA en el análisis debido a que se ha descrito su participación en estrés a través de la regulación de los factores SPL (ver Tabla 2.1).

También se seleccionaron tres miRNAs no conservados en las plantas terrestres pero que se encontraron por secuenciación en *M. polymorpha*. El MpmiR11732 se escogió por tener más veces de cambio en NaCl 150 mM y un valor de confianza alto sobre éste (FC de 11.35 y p-val=0.067). El MpmiR11753 se seleccionó debido a que ya se había identificado por ensayos tipo Northern blot en talos de *M. polymorpha* (Reyes-Taboada, datos no publicados) y, el MpmiR11742a que tiene un valor de confianza alto sobre las veces de cambio encontradas en talos expuestos a NaCl 150 mM (FC de 0.23 y pval=0.049) y el miR11742b (FC de 0.26 y pval=0.1460 en NaCl 150 mM). Cabe señalar, que el oligonucleótido diseñado para la amplificación de este microRNA hibrida con las dos isoformas porque las secuencias en la región 3' son conservadas.

Respecto a la respuesta al tratamiento con NaCl, dos de los miRNAs seleccionados se sobre expresan en talos tratados con NaCl 150 y 250 Mm, (miR319 y miR11742a/b), dos disminuyen en talos tratados con NaCl 150 y 250 Mm, (miR166 y miR11732) y la expresión del miR11753 no cambia en talos expuestos a NaCl 150 mM, pero disminuye su acumulación en talos expuestos a NaCl 250 mM.

En la Tabla 6.4 se enlistan los miRNAs que se analizaron mediante RT-qPCR. Se indica su secuencia, las veces de cambio (FC) que reportó el análisis de expresión diferencial

realizado por la UUSMB para NaCl 150 y 250 mM y la significancia estadística del análisis de FC.

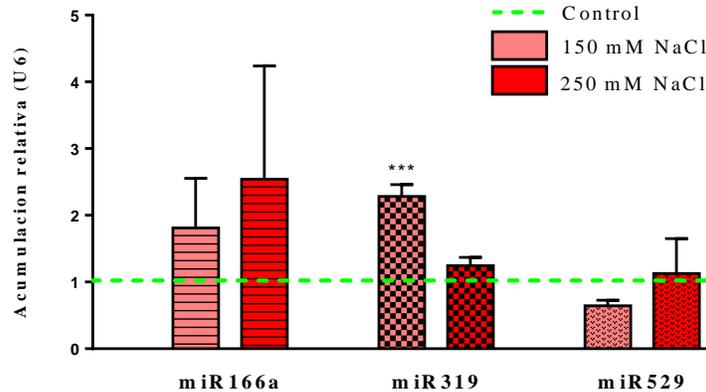
**Tabla 6.4 miRNAs seleccionados para analizar mediante RT-qPCR**

Tipo	Nombre del miRNA	Secuencia (5'-3')	Veces de cambio en su acumulación en talos tratados con NaCl (mM)			
			150		250	
			FC	<i>p-value</i>	FC	<i>p-value</i>
C	MpmiR166a	TTCGGACCAGGCTTCATTCCC	1.80	0.425	2.75	0.633
	MpmiR319a	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC	0.77	0.758	0.88	0.742
	MpmiR529c.1	CCAGAAGAGAGAGAGCACAGC	na		na	
NC	MpmiR11732	GTGCTTGACTGCAAGATGGGC	11.35	0.067	1.18	0.456
	MpmiR11742a	CGGACTCCAGTTGGCATGTGC	0.23	0.049	0.15	0.530
	MpmiR11742b	CGGACCTCAGTTGGCATGTGC	0.26	0.146	0.08	0.803
	MpmiR11753	TCTCGCGAATCGGATGGAAGGA	0.95	0.400	Inf	0.985

Nota: La tabla muestra seis miRNAs de *M. polymorpha*, de los cuales cinco se acumulan diferencialmente en talos expuestos a NaCl (secuenciación). Los valores corresponden al FC o veces de cambio. En la tabla, los valores >1.1 indican una disminución en la acumulación del miRNA en los talos tratados respecto a talos control, valores <0.9 indican un aumento en la acumulación relativa en talos tratados respecto a control. Los miRNAs con veces de cambio igual a 1±0.1 en salinidad se consideran igual a control. Inf expresa que en el tratamiento con NaCl las lecturas fueron cero y sólo hubo lecturas en la condición control. na indica que no se identificó en la secuenciación. C, miRNAs conservados con otras plantas terrestres, NC, miRNAs no conservados con otras plantas terrestres.

Los experimentos de cuantificación relativa mediante RT-qPCR se realizaron en tres replicas independientes. De dos de estas réplicas se obtuvo a su vez el RNA para la secuenciación masiva. Los tratamientos, se llevaron a cabo de acuerdo con la sección 5.6 y 5.7. Las gráficas indican la acumulación relativa del miRNA normalizando los datos respecto al gen de referencia (*U6 snRNA*) en cada tratamiento, y posteriormente normalizando la acumulación de cada miRNA respecto a su propia acumulación en control. La muestra control se compara contra si misma por lo que el valor de referencia obtenido es uno (línea punteada).

A continuación, se presenta la acumulación relativa de los miRNAs miR166, miR319 y miR529 que son conservados en plantas terrestres y fueron evaluadas en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM (Figura 6.14).



**Figura 6.14 Acumulación relativa de miR166, miR319 y miR529 en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM.** La acumulación normalizada al snRNA U6 se representó relativa a la acumulación de cada mRNA en los talos control establecida como 1 (línea punteada). Las barras corresponden al error estándar de tres réplicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA y comparaciones entre los tratamientos con la prueba de Tukey para cada miRNA. Las pruebas indicaron que no existe una diferencia significativa para miR166a:  $F(2,6) = 0.5188$   $p = 0.62$ , ni para miR529:  $F(2,6) = 0.6642$   $p = 0.55$ , pero se encontró una diferencia significativa en la acumulación de miR319 en talos tratados con NaCl 150 mM:  $F(2,6) = 29.37$ ,  $*** = p = 0.0001-0.001$ , sin embargo, no fue significativa en talos tratados con NaCl 250 Mm.

La acumulación del miR166 no cambió significativamente tras la exposición de los talos a NaCl (Figura 6.14). El análisis de expresión diferencial sugirió que la acumulación de este miRNA disminuye 0.55 veces ( $FC = 1.8$ ) durante la exposición a NaCl 150 mM y 0.36 veces ( $FC = 2.75$ ) durante la exposición a 250 mM. Sin embargo, hay que tomar con cuidado estos datos ya que el análisis estadístico sobre el FC para este miRNA en cada condición sugirió que son valores poco fiables. Se reportó un  $p\text{-value} = 0.425$  y  $p\text{-value} = 0.633$  para el cambio en la expresión de este miRNA en NaCl 150 y 250 mM respectivamente, es decir, un 42.5% y un 63.3% de posibilidades de que la diferencia encontrada fuera por azar y no debida al efecto del tratamiento con NaCl.

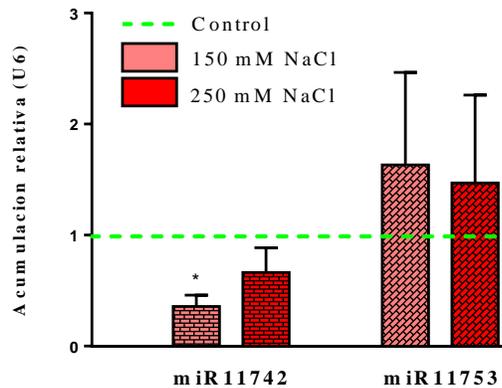
La evaluación de la acumulación relativa del miR319 mediante RT-qPCR indicó que su acumulación aumentó significativamente en talos expuestos a NaCl 150 mM, pero su acumulación no cambió en talos expuestos a NaCl 250 mM. Los resultados obtenidos por secuenciación masiva sugirieron que la acumulación del miR319 aumentó su acumulación 1.3 veces ( $FC = 0.77$ ) y 1.25 veces ( $FC = 0.8$ ) en talos expuestos a NaCl 150 y 250 mM

respectivamente, aunque la prueba estadística indicó que estas diferencias no eran fiables ( $p\text{-val}=0.758$  y  $p\text{-val}=0.742$  respectivamente). Por lo tanto, se confirmó que la acumulación de miR319 aumentó en talos expuestos a NaCl 150 mM, pero en los talos expuestos a NaCl 250 mM, no se pudo confirmar mediante RT-qPCR el aumento encontrado por secuenciación masiva.

El miR529 no fue identificado por la secuenciación masiva realizada en este estudio, sin embargo, se acumuló en talos control y en talos tratados con NaCl 150 y 250 mM y se cuantificó por RT-qPCR. La cuantificación de la acumulación de miR529 por RT-qPCR indicó que no cambia en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM, a pesar de que se observó una ligera tendencia en los talos expuestos a 150 mM que resultó no ser significativa al analizarse mediante una prueba de ANOVA de una vía.

Además de miR166, miR319 y miR529, que son miRNAs conservados, se analizó la acumulación relativa de tres miRNAs no conservados: miR11742, miR11753 y miR11732. Se encontró que el miR11742 y el miR11753 se acumularon en talos expuestos a condiciones óptimas y en talos expuestos a los tratamientos con NaCl (Figura 6.15). Por otro lado, no fue posible detectar al miR11732, aunque la secuenciación indicó que se encontró en los talos analizados.

Es contrastante que el miR529 que no se detectó por secuenciación masiva, pudo ser detectado mediante RT-qPCR, y el miR11742 que fue identificado mediante secuenciación masiva, no pudo ser amplificado por RT-qPCR. De acuerdo con la literatura, las dos técnicas son altamente sensibles. Las ventajas que la secuenciación masiva ofrece sobre el RT-qPCR son, el análisis simultaneo de varias secuencias y su poder de descubrimiento, ya que no se requiere un conocimiento previo de la secuencia para encontrarla, a diferencia del RT-qPCR que requiere el diseño de oligonucleótidos basados en la secuencia de interés (Git *et al.*, 2010).



**Figura 6.15 Acumulación relativa de miR11742 y miR11753 en talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM.** La acumulación normalizada al snRNA U6 se representó relativa a la acumulación de cada mRNA en los talos control referida como 1 (línea punteada). Las barras corresponden al error estándar entre tres réplicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA y comparaciones entre los tratamientos con la prueba de Tukey para cada miRNA. Se encontró una diferencia significativa entre la acumulación de miR11742 en talos control y los tratados con NaCl 150 mM  $F(2,6)= 5.115$ , \*  $p \leq 0.05$ , sin embargo, no se encontró diferencia al comparar la acumulación de miR11742 entre control y NaCl 250 mM. Tampoco se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, en la acumulación de miR11753:  $F(2,6)= 0.244$ ,  $p=0.7906$ .

Los datos obtenidos mediante secuenciación masiva indicaron que el miR11742a incrementó su acumulación 4.35 veces ( $FC= 0.23$ ,  $p\text{-val}=0.049$ ) en talos expuestos a NaCl 150 mM e incrementó su acumulación 6.67 veces ( $FC= 0.15$ ,  $p\text{-val}=0.530$ ) en talos expuestos a NaCl 250 mM, respecto a su acumulación en talos control. Inesperadamente, mediante RT-qPCR se encontró que la acumulación del miR11742 disminuyó significativamente en los talos expuestos a NaCl 150 mM, a pesar de que los datos de secuenciación indicaban que el aumento encontrado fue confiable estadísticamente. A su vez, mediante RT-qPCR se encontró que la acumulación de este miRNA no cambió significativamente durante el tratamiento con NaCl 250 mM. Por otro lado, de acuerdo con los resultados de la secuenciación masiva, la acumulación del miR11753 en talos tratados con NaCl 150 mM corresponde a 1.06 veces su valor en control ( $FC= 0.95$   $p\text{-value}= 0.4$ ), por lo que entra en la categoría donde no se espera cambio entre el tratamiento con NaCl respecto a control. Además, no se detectó en la biblioteca de NaCl 250 mM y, debido a que, si se encontró en la muestra control, esto se interpreta como una disminución en su acumulación en el tratamiento

con 250 mM de NaCl, indicado como *inf.* La estadística asociada ( $p\text{-value}=0.985$ ) sugiere que no es confiable ya que hay un 98.5 % de posibilidades de que este cambio se deba al azar. Mediante RT-qPCR se encontró que no hay un cambio significativo en la acumulación relativa del miR11753 en ninguno de los dos tratamientos con NaCl, lo que es consistente con lo que sugirieron los datos de secuenciación masiva.

Los resultados obtenidos, agregan un punto de discusión en la comparación entre la técnica de secuenciación masiva y la técnica de RT-qPCR, ya que los resultados del análisis de expresión diferencial ofrecido por una u otra técnica no son consistentes entre sí en todos los casos. En esto, tiene un gran peso el hecho de que fuera tan poco confiable el análisis estadístico sobre el valor de FC para cada miRNA ( $p\text{-value} > 0.05$ ). También cabe señalar que los datos de secuenciación se normalizaron respecto al tamaño de la biblioteca y, por otro lado, la cuantificación relativa obtenida por qPCR se normaliza con U6. Esto será motivo de discusión más adelante.

Tomando en conjunto los resultados presentados, se infiere que la acumulación de algunos miRNAs en *M. polymorpha* cambia en respuesta a la exposición a medio salino (miR319 y miR11742), y que la acumulación de otros miRNAs no fue afectada por los tratamientos con NaCl (miR166, miR11753 y miR529). Aunque la acumulación de miR11732 no se pudo cuantificar, y que los cambios en la acumulación diferencial en respuesta al medio salino no se reproducen fielmente mediante RT-qPCR, se encontró que la acumulación de miR319 y miR11742 responde al tratamiento con NaCl 150 mM, lo que nos permite inferir que participan en la respuesta al estrés hídrico y iónico implicado por este tratamiento, debido a que los miRNAs regulan negativamente a sus mRNA blancos, su participación en la respuesta a estrés depende quienes sean sus blancos y los procesos que regulan o llevan a cabo.

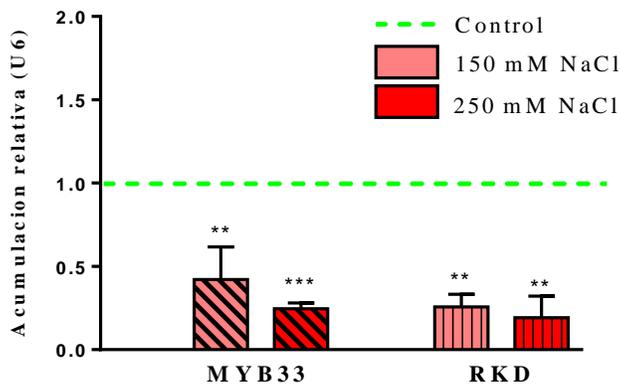
El miR11742 es un miRNA no conservado con otras plantas terrestres, que fue identificado *M. polymorpha* por Tsuzuki *et al.*, (2016), donde se identificaron dos versiones pertinentes a esta familia, el miR11742a y miR11742b. En este estudio también encontraron estas dos secuencias pertinentes a esta familia y también se encontró que el miR11742a es la isoforma más abundante (Tabla 6.3). Sin embargo, en la literatura, no se han registrado mRNAs blanco para este miRNA.

EL miR319 es conservado en las plantas terrestres que participa en el desarrollo vegetal y responde a diferentes tipos de estrés (Tabla 2.1). Pin-Chun Lin *et al.*, (2016) y Tsuzuki *et al.*, (2016) reportaron que encontraron a miR319 en *M. polymorpha*, y propusieron al factor de transcripción RKD y MYB33 como posibles blancos. Garcias-Morales, (2016) en un trabajo independiente del grupo validó los blancos propuestos para este miRNA y analizar su función. En su trabajo, Garcias-Morales (2016) confirmó la acumulación de la secuencia madura de miR319 en gemas y talos de 7 y 14 días, caracterizó la estructura tallo-asa de su precursor y presentó evidencia de que este precursor es procesado para generar la secuencia madura de este miRNA, además, demostró que los transcritos que generan los factores de transcripción MYB33 y RKD son regulados por miR319 y que su sobreexpresión ectópica baja la acumulación de sus mRNAs blanco y genera defectos del desarrollo en el talo.

Considerando esto, se analizó la acumulación de los dos mRNAs blanco de miR319 en los talos expuestos a estrés salino con el fin de saber si el cambio en la acumulación de miR319 durante la exposición a medio salino, afecta la acumulación de sus mRNAs blanco, lo que nos permitiría inferir si estos dos factores transcripcionales participan en la respuesta a estrés salino en *M. polymorpha*.

#### 6.4.5 Acumulación relativa de mRNA de MpMYB33 y MpRKD, blancos de miR319

Se evaluó mediante RT-qPCR la acumulación de los transcritos de MpRKD (Mapoly0022s0128, genoma de *M. polymorpha* v 3.1, Phytozome) y de MpMYB33 (Mapoly1089s0002, genoma de *M. polymorpha* v 3.1, Phytozome) en los talos control o expuestos a NaCl 150 o 250 mM (Figura 6.16). La acumulación de un miRNA ejerce una regulación negativa en la acumulación de su mRNA blanco, se espera que en NaCl 150 mM donde la acumulación del miR319 aumenta significativamente, la acumulación de sus mRNAs blanco disminuya.



**Figura 6.16 Acumulación relativa de los transcritos de *MpRKD* y de *MpMYB33* en talos expuestos a NaCl 150 y 250 mM.** La acumulación normalizada al mRNA del factor *MpEF1a*, se representó relativa a la acumulación de cada mRNA en los talos control, establecido como 1 (línea punteada). Las barras corresponden al error estándar entre tres réplicas independientes. Se realizó una prueba de ANOVA y comparaciones entre los tratamientos con la prueba de Tukey para cada miRNA. Se encontró una diferencia significativa en la acumulación del mRNA de *MYB33* entre control y los tratamientos: NaCl 150 mM:  $F(2,6)=35.36$ , \*\* =  $p = 0.001 - 0.01$ , NaCl 250 mM: \*\*\*=  $p = 0.0001-0.001$ . También se encontró diferencia significativa en la acumulación del mRNA de *RKD* en talos expuestos a NaCl respecto a control:  $F(2, 6) = 26.88$ , \*\* =  $p = 0.001 - 0.01$ .

La gráfica muestra que la acumulación relativa de los mRNAs blanco de miR319 disminuyó en talos expuestos a NaCl 150 mM, donde se encontró evidencia del aumento de la acumulación de miR319. Además, resulta interesante que la acumulación de los transcritos blanco de miR319 disminuya en los talos expuestos a NaCl 250 mM, donde miR319 no mostró un aumento en su acumulación, lo que permite inferir que hay otros factores que afectan la acumulación de los transcritos de *MpMYB33* y de *MpRKD* durante la exposición a NaCl 250 mM.

## 7 Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el talo de *M. polymorpha* sufrió cambios a nivel morfológico, fisiológico y/o molecular cuando se expuso a tratamientos de salinidad o ABA, y que algunos miRNAs están implicados en la respuesta molecular. La Tabla 7.1 muestra un resumen de los resultados.

**Tabla 7.1 Resumen de resultados**

Aspecto evaluado	NaCl (mM)			ABA ( $\mu$ M)	ABA 1, 5, 10 → NaCl 150 mM
	150	250	500	1, 5, 10	
<i>Talo</i>	Lóbulos del talo similares a control. Pérdida de turgencia, clorosis, ruptura del tejido en la zona central	Pérdida de turgencia y de la integridad de los tejidos en la zona central y meristemos, clorosis en los meristemos	Pérdida de turgencia, clorosis, oxidación y pérdida de integridad de los tejidos en la zona central y meristemos	Similar a control Aparición de rizoides en la epidermis superior en la zona central del talo	Similar a control incluyendo la zona de los meristemos y en la zona central del talo
<i>Relocalización de los cloroplastos</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>Fotosíntesis activa</i>	Si	No	No	Si	Si
<i>Potencial osmótico</i>	Baja <sup>1</sup>	Baja	Baja	Similar a control	Baja
<i>Peso fresco</i>	Baja	Baja	Baja	1, 5: bajan 10: similar a control	1, 5 y 10 bajan respecto a control 10: Aumenta respecto a NaCl
<i>Peso seco</i>	Similar a control	Similar a control	Similar a control	Similar a control	Similar a control
<i>Acumulación del mRNA de la MpLEA 7</i>	Incrementa respecto a control	Incrementa respecto a control			
<i>Acumulación del mRNA de la MpDCL</i>	No cambia	Baja			
<i>Acumulación del mRNA de la MpAGO1</i>	No cambia	No cambia			
<i>miRNAs que se acumulan diferencialmente (secuenciación masiva)</i>	60 miRNAs				

Aspecto evaluado	NaCl (mM)	
	150	250
<i>Acumulación de miRNAs mediante RT-qPCR</i>		
<i>MpmiR166</i>	No cambia	No cambia
<i>MpmiR319</i>	Aumenta	No cambia
<i>MpmiR529</i>	No cambia	No cambia
<i>MpmiR11753</i>	No cambia	No cambia
<i>MpmiR11742</i>	Baja	No cambia
<i>MpmiR11732</i>	No es cuantificable	No es cuantificable
<i>Acumulación de los blancos de miR319</i>		
<i>MpMYB33</i>	Baja	Baja
<i>MpRKD</i>	Baja	Baja

Nota: 1. Se anotó que baja el potencial osmótico en talos expuestos a NaCl 150 mM a pesar de que en un set de experimentos (3 réplicas) no hubo cambios, y en otro set de experimentos (tres réplicas) si disminuyó significativamente, ya que experimentos independientes reportaron disminución del potencial osmótico en estas condiciones.

## **7.1 El estrés salino causa cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares en *M. polymorpha***

Los tres tratamientos de NaCl estudiados generaron desde efectos morfológicos leves en el talo de *M. polymorpha* localizados en el centro del talo (150 mM) hasta efectos severos que se extienden a los lóbulos del talo y áreas meristemáticas (250 y 500 mM) a nivel morfológico (Figura 6.1). Estos efectos son, pérdida de turgencia del tejido, clorosis y blanqueamiento del tejido, posible oxidación (no se corroboró el aumento de ERO), y aparente pérdida de la integridad celular al observarse al microscopio, lo que previamente fue descrito por Godínez-Vidal (2020), que analizó la fuga iónica en los tres tratamientos asociado a la muerte celular, mediante la tinción con azul de Evans (D. F. Gaff y Okong'O-Ogola, 1971). También se debe considerar que los rizoides se ven afectados en los tratamientos de salinidad (datos no mostrados); al ser éstos estructuras unicelulares que por su posición se encuentra en contacto íntimo con el medio al ser el sistema de anclaje al mismo.

Los tratamientos con NaCl indujeron la relocalización de los cloroplastos hacia la periferia celular (Figura 6.2). A nivel metodológico resultó complicado documentar la relocalización de los cloroplastos mediante microscopía óptica. Las micrografías de la figura 6.2 muestran la zona dorsal del talo, en una región cercana al meristemo. Debido a la morfología del talo resultó complicado encontrar un plano que permitiera registrar claramente la relocalización de los cloroplastos debido a los alcances de esta microscopía para enfocar un campo coplanar en un tejido tridimensional, a pesar de que el efecto resultó evidente al observarlo directamente, cambiando el plano enfocado. Por ejemplo, en la figura 6.2 H, pareciera que no todas las células experimentan la relocalización de los cloroplastos, sin embargo, al mover el foco sí se observó. Esto sugiere que la microscopía óptica de fluorescencia no es la mejor técnica para observar este efecto; una mejor técnica sería la microscopía confocal. Además, la morfología distinta de las células observadas se debe a que no siempre fue posible capturar la imagen en el mismo tipo celular (epidermis o parénquima).

Una vez realizadas estas consideraciones metodológicas, hay que señalar que la relocalización de los cloroplastos observada, es consistente con observaciones de otros autores (Godínez-Vidal *et al.*, 2020; Ogasawara *et al.*, 2013; Suetsugu y Wada, 2007). La relocalización de los cloroplastos puede ser activa o puede ser pasiva, es decir, puede deberse

a un mecanismo activo que promueva el movimiento de los cloroplastos a una ubicación específica mediante el citoesqueleto o puede ser una consecuencia del incremento en el tamaño de la vacuola, caso en el que se consideraría una relocalización a través de un mecanismo pasivo.

La relocalización de los cloroplastos es un fenómeno que se ha observado ampliamente en plantas vasculares y no vasculares en respuesta al estrés abiótico (Suetsugu y Wada, 2007; Wada *et al.*, 2003). El movimiento de los cloroplastos en respuesta a la luz acuñó el término *respuesta de evitación*. Los cloroplastos se ubican en la célula para maximizar su exposición a la fuente luminosa, por lo que lo hacen en el plano en el que se orienta la lámina foliar a la luz. Esta posición se denomina periclinal (paralela a la superficie del talo). Si la radiación recibida es mayor a la necesaria, los cloroplastos pasan a una posición paraclinal (transversal a la superficie del talo), evitando la exposición directa de los fotosistemas a la fuente de luz para evitar que se dañen. Este movimiento es regulado de manera activa través de fotorreceptores y ejecutado mediante el citoesqueleto de actina (Suetsugu y Wada, 2007).

Godínez-Vidal *et al.* (2020), determinaron mediante microscopia confocal y electrónica, que el movimiento de los cloroplastos también ocurre durante estrés salino en *M. polymorpha* y sugirieron que es un movimiento pasivo como consecuencia de la expansión de vacuola central. En dicho trabajo se demostró que en los talos expuestos a condiciones control, los cloroplastos, pequeñas vacuolas y otros organelos se localizan de manera periclinal con distribución homogénea. En contraste, durante la exposición de los talos a medio salino, observaron una vacuola central grande, rodeada de los cloroplastos distribuidos de manera periclinal (paralelos a la superficie del talo) y paraclinal (transversales a la superficie del talo). Esto sugiere que el movimiento de los cloroplastos inducido por estrés salino se regula de manera distinta que la relocalización inducida por estrés lumínico. La expansión de la vacuola obedece a su papel en la defensa de la célula ante el estrés iónico, ya que se ha descrito que el ion  $\text{Na}^+$  es compartimentalizado principalmente en la vacuola central con el fin de evitar su efecto tóxico (Deinlein *et al.*, 2014). En consecuencia, el potencial hídrico generado en la vacuola promueve que el agua ingrese incrementando su volumen. De manera interesante, Godínez-Vidal *et al.*, (2020) mostró que los cambios en la vacuola no sólo se restringen a la respuesta del talo al NaCl, sino que también ocurre durante

déficit hídrico (60% de humedad relativa) y el por tratamiento con ABA exógeno. Esta última observación es consistente con los resultados obtenidos con los tratamientos realizados con esta fitohormona en este trabajo.

Otro efecto de los tratamientos con NaCl fue la perceptible disminución en el tamaño de los talos (Figura 6.1), aunque no se registró una diferencia significativa al comparar el peso seco de los talos expuestos a condiciones control y a los tratamientos de NaCl (Figura 6.5). Esto sugiere que el crecimiento no se ve afectado por los tratamientos o que 24 h es un periodo muy corto para observar diferencias entre los grupos experimentales. Estudios recientes que indican que el talo de *M. polymorpha* desarrollado a partir de gemas, crece de manera exponencial durante los primeros 16 días (Solly *et al.*, 2017) con lo que cabría esperar que 24 h fueran suficientes para observar el efecto de los tratamientos en el crecimiento del talo, sin embargo, hay que considerar que la masa evaluada en este trabajo fue muy pequeña, en el orden de los miligramos, a pesar de que las muestras estaban compuestas al menos 80 talos por tratamiento en cada réplica, esto se debe a que la masa de una planta se compone principalmente de agua (Taiz y Zeiger, 2010), por lo cual este experimento se ve limitado para definir si los tratamientos afectan la acumulación de biomasa.

Ante la observación de la disminución del tamaño de los talos expuestos a los tres tratamientos con NaCl, Godínez-Vidal *et al.*, (2020) probaron otro enfoque, comparando las áreas de los talos en los mismos tratamientos, demostrando que la exposición a estrés salino afecta el área del talo desde 9 y 12 h de tratamiento, con una disminución del 21% del área. El análisis del área, en lugar de la masa es la metodología más adecuada para evaluar cambios en tiempos cortos en *M. polymorpha*, dadas sus características de hábito de crecimiento. Ya que no se puede descartar el posible efecto del tratamiento con NaCl en el crecimiento, sería útil repetir la evaluación del peso fresco y el peso seco con una cantidad mayor de talos para obtener resultados que no estuvieran comprometidos por la capacidad del instrumento de medición.

De acuerdo con las observaciones realizadas, si la masa de los talos no cambió hasta donde fue posible definir y, por otro lado, el área si fue afectada, se infiere que este cambio se debe a otros factores. La disminución en el tamaño de los talos puede ser afectada por la pérdida de la turgencia celular debida a la pérdida de agua (Bray *et al.*, 1997; Proctor *et al.*,

2007). La subsecuente marchitez es un efecto clásico de la falta del recurso hídrico en plantas vasculares (Bray *et al.*, 1997), y se observa como una disminución en el potencial osmótico (Arroyo, 2012; Bray *et al.*, 1997) lo que es consistente con los resultados observados.

Se encontró que el potencial osmótico, disminuyó en talos expuestos a NaCl 150 mM (Figura 6.11) NaCl 250 y 500 mM (Figura 6.4), aunque caben aclaraciones dentro de esta aseveración. En la figura 6.4 se encontró que el potencial osmótico no disminuyó en los talos tratados con NaCl 150 mM, pero al repetir esta condición en el experimento para los talos tratados con ABA (Figura 6.11), se encontró que si disminuyó. De manera independiente, Godínez-Vidal (2020) encontró que el potencial osmótico disminuye en talos tratados con NaCl 150, 250 y 500 mM. Estas observaciones permiten inferir que hubo sesgo al evaluar el potencial osmótico en los experimentos de la figura 6.4. por lo tanto, se tienen que repetir este experimento de evaluación del potencial. A pesar de que es necesario corroborar el efecto del NaCl 150 mM en el potencial osmótico de los talos, la evidencia en su conjunto sugiere que, si hay un efecto del NaCl sobre el potencial osmótico, posiblemente desde el tratamiento con NaCl 150 mM. Esto es consistente además con la observación de que los talos expuestos a los tres tratamientos de NaCl perdieron agua respecto a los talos control (Figura 6.5), aunque no sólo la pérdida de agua en el tejido vegetal conlleva el decremento del potencial osmótico, también la síntesis de osmolitos compatibles y el ingreso de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . (Madhava Rao *et al.*, 2006).

Aunque a nivel morfológico los tres tratamientos no generan efectos similares (Figura 6.1), los tres tratamientos inducen de manera similar la relocalización de los cloroplastos (Figura 6.2), inducen cambios similares en la pérdida de agua (Figura 6.5), y un decremento similar en el potencial osmótico (6.4) ya que se encontraron diferencias significativas en las comparaciones contra el grupo control, pero no en las comparaciones entre los tratamientos (pruebas de ANOVA de una vía). Sin embargo, en el análisis de la tasa fotosintética, si encontraron diferencias entre el tratamiento con NaCl 150 mM y los tratamientos con 250 y 500 mM.

Con el fin de inferir el estatus fisiológico de la planta durante la exposición a estrés, se evaluó la tasa fotosintética en los talos tratados con NaCl. Se esperaba que la exposición a cualquiera de las condiciones de estrés salino implicara un efecto negativo en la actividad

fotosintética, debido a que en todas las condiciones se observó un cambio morfológico. Los resultados (Figura 6.3) mostraron que los talos expuestos a NaCl 150 mM mantuvieron la tasa fotosintética activa como se observó en los talos control, mientras que los talos expuestos a NaCl 250 y 500 mM perdieron la actividad fotosintética. Estos resultados indican que la exposición a NaCl 150 mM durante 24 h no es una condición que afecte la fijación del carbono, sugiriendo que este tratamiento puede considerarse moderado y que la respuesta fisiológica de los talos al NaCl 150 mM es diferente respecto a la respuesta inducida por los tratamientos con mayores concentraciones de NaCl.

Las limitantes metodológicas de estos ensayos fueron la alta sensibilidad de los talos a la deshidratación y la pequeña cantidad de biomasa en los 80 talos por réplica independiente. Estimar la tasa fotosintética fue extremadamente difícil en este modelo debido a que los talos son muy sensibles a la deshidratación ante un flujo de aire y el sistema de medición de CO<sub>2</sub> requiere que la muestra interactúe con una fuente de aire seco lo que causa la pérdida de humedad en los talos durante las mediciones. Para mantener vivos los talos durante los experimentos se agregó un disco de papel filtro saturado con agua destilada (figuras en el ANEXO B I), esto protegió a los talos de la deshidratación. Por otro lado, en briofitas, la asimilación de carbono se normaliza respecto a la biomasa empleada para realizar esta medición. Ya que la masa fresca cambia entre el grupo control y los tratamientos, se empleó la masa seca. De acuerdo con Cici Hall, contacto de apoyo de LI-COR Biosciences, la masa que se usó para realizar los experimentos se encuentra muy cerca del límite de detección del LI-COR 6400 empleado para realizar las mediciones, (comunicación personal, 2020). Es por esto por lo que en los resultados de la figura 6.3 solo se toma en cuenta el resultado cualitativo (fotosíntesis activa o no activa) y no las comparaciones finas entre los grupos que pertenecen a la misma categoría.

Las observaciones realizadas en este trabajo, en conjunto con los resultados obtenidos por Godínez-Vidal et al (2020), esbozan una imagen de la respuesta morfológica y fisiológica de *M. polymorpha* ante el estrés osmótico e iónico implicado por el medio salino. El medio con NaCl 150 mM, es una condición de estrés moderada, que generó daño celular observable como clorosis y blanqueamiento del tejido en los talos únicamente en la región central. Este

tratamiento indujo la relocalización de los cloroplastos debida al incremento en el volumen de la vacuola. Además, induce la pérdida de agua en los talos e incrementa el potencial osmótico. No obstante, los talos expuestos a esta concentración de NaCl durante 24 h fueron capaces de continuar asimilando CO<sub>2</sub> lo que permite inferir que mantienen su metabolismo activo y posiblemente podrían acumular biomasa.

Por otro lado, la exposición a NaCl 250 o 500 mM es severa. Además de los efectos observados en los talos expuestos a NaCl 150 mM, las concentraciones más altas de NaCl impidieron que el talo asimilara CO<sub>2</sub>. A nivel morfológico los talos expuestos a NaCl 250 o 500 mM, mostraron daños severos: zonas cloróticas y con pérdida de turgencia, blanqueamiento de los tejidos que se extiende a los lóbulos del talo y a las zonas meristemáticas, sobre todo, en los talos expuestos a NaCl 500 mM donde se observa zonas marrones que de acuerdo con Godínez-Vidal 2020, corresponderían a zonas necróticas y la pérdida de la turgencia en todo el talo, además de que se desintegraron al manipularlos, por lo que no se analizaron en experimentos subsecuentes. De esta manera se definió el tratamiento con NaCl 150 mM como una condición de estrés moderado y el tratamiento con NaCl 250 mM como una condición de estrés severo en la que se observa una respuesta similar al tratamiento con 500 mM pero que permite manipular el talo para los experimentos subsecuentes.

## **7.2 El papel del ABA en la respuesta a estrés en *M. polymorpha* y su vínculo con los miRNAs**

En estos experimentos se mostró que el tratamiento con ABA no afectó de manera negativa el fenotipo de los talos (Figura 6.6) aunque fue posible observar que aparecieron rizoides en la epidermis superior de la zona central del talo, sin embargo, este efecto no fue documentado sistemáticamente en la población tratada. Por otro lado, el tratamiento con ABA no afectó de manera negativa la asimilación de carbono (Figura 6.9), lo que sugiere que los procesos metabólicos continúan activos.

Se observó la relocalización de los cloroplastos hacia la periferia celular (Figura 6.7) asociada a la expansión de la vacuola (Godínez-Vidal *et al.*, 2020). En los talos expuestos a NaCl, implica el estrés osmótico y la acumulación de los iones Na<sup>+</sup> en la vacuola para evitar

su efecto tóxico (Deinlein *et al.*, 2014), promoviendo la difusión del agua hacia la vacuola y favoreciendo el incremento en su tamaño. Esta explicación no tiene cabida en los tratamientos con ABA, por lo que debe ser otro mecanismo el que dicta la expansión de la vacuola.

La síntesis de osmolitos compatibles es un efecto del estrés hídrico (Redondo-Gómez, 2013) y pudiera ser parte del incremento observado en la vacuola, sobre todo en ausencia del efecto iónico del  $\text{Na}^+$ . En los talos tratados con las tres concentraciones de ABA probadas, no se observó una disminución del potencial osmótico (Figura 6.10), lo que sugiere que este tratamiento no indujo la acumulación de osmolitos de forma medible o que los cambios en la osmolalidad, que llevan al crecimiento de la vacuola se deben a solutos tomados del citoplasma, periplasma y/o sintetizados en respuesta a la señalización mediada por ABA. Además, las moléculas de ABA que se internalizan en los talos pueden tener un efecto osmótico como cualquier otra molécula en la célula, aunque esto es poco probable ya que la adición de ABA exógeno no disminuyó el potencial osmótico. Otra posibilidad es que el incremento en los osmolitos se equilibró con el aumento de agua almacenada en la vacuola correlacionado con su aumento de volumen, impidiendo observar cambios en el potencial osmótico evaluado. En contraste, se registró un decremento en el peso fresco en los tratamientos con NaCl 150 y 250 mM (Figura 6.11). Esta observación no es compatible con la observación de que el potencial osmótico no cambia, ya que, al perder agua, el potencial osmótico debería disminuir. Ya que la masa evaluada es muy pequeña, lo mejor sería repetir estas observaciones incrementando la cantidad de talos por muestra.

Las observaciones realizadas, sugieren que existe un mecanismo coordinado por ABA que promueve el crecimiento de la vacuola en respuesta a estrés salino, ya que la aplicación de esta fitohormona de manera exógena fue suficiente para inducir el cambio en el tamaño de la vacuola y, la relocalización de los cloroplastos hacia la periferia celular (Figura 6.8).

En este sentido, resulta muy interesante que en los experimentos llevados a cabo por Godínez-Vidal *et al.* (2020), se identificó mediante transcriptómica, que en los talos expuestos a ABA se incrementa la abundancia de transcritos que corresponden al transporte de metabolitos y disminuyó la acumulación de mRNAs relacionados con la fotosíntesis, entre

otros. Se detectaron genes relacionados con funciones como la unión a metales como manganeso y cobre, genes con actividad de transportadores membranales, actividad de oxidorreductasa y función antioxidante.

Se ha observado que el pretratamiento con ABA tiene un efecto de protección ante estrés (Akter *et al.*, 2014; Pence *et al.*, 2005), y por esta razón se realizaron los experimentos de pretratamiento con diferentes concentraciones de ABA y una posterior exposición a NaCl 150 mM. Los parámetros en los que se pudiera observar un efecto protector durante este tratamiento son en la respuesta morfológica en la zona central del talo, en el potencial osmótico y en el peso fresco. Se encontró que los efectos morfológicos observados en la región central de los talos expuestos a NaCl 150 mM (Figura 6.1 F-H), no se observaron en los talos pretratados con ABA 1, 5 o 10  $\mu$ M (Figura 6.6 N-O). Sin embargo, se encontró que el pretratamiento con ninguna de las tres concentraciones de ABA evita la disminución del potencial osmótico (Figura 6.10) ni la pérdida de agua observadas en los talos tratados con NaCl 150 mM (Figura 6.11). Esto sugiere que el pretratamiento a partir de ABA 1  $\mu$ M, evita los efectos de daños discretos inducidos por NaCl 150 mM.

Debido a que el tratamiento con NaCl 150 mM afecta de manera moderada la morfología del talo y no afecta la tasa fotosintética, es necesario conocer el efecto del pretratamiento con ABA en la posterior exposición a condiciones más severa de estrés salino (NaCl 250 o 500 mM), con el fin de corroborar el efecto protector sugerido en este ensayo. Este experimento se propuso como una aproximación preliminar que se vería complementada con la exploración del efecto del pretratamiento con ABA, en los otros tratamientos con NaCl analizados. Sin embargo, se decidió detener la caracterización morfológica de la respuesta de *M. polymorpha* a ABA y continuar con el objetivo de explorar la participación de los miRNAs durante estrés salino.

Conocer el efecto del ABA en los talos de *M. polymorpha* y tratar de dilucidar si el pretratamiento con esta fitohormona puede proteger los talos de los efectos del medio salino, nos permite inferir que los ajustes fisiológicos necesarios para contender con este tipo de estrés son regulados a través de esta fitohormona. La regulación de la respuesta a estrés

mediada por el ABA, ha sido ampliamente estudiada y se sabe que algunos miRNAs responden a este fitorregulador (Tabla 2.1).

Los tres miRNAs conservados cuya acumulación diferencial se analizó mediante RT-qPCR, están ligados a la señalización mediada por ABA (Tabla 2.1). miR166 que habitualmente se cita como miR166/165 en *A. thaliana*, participa en la regulación del desarrollo vegetal, sus blancos son factores transcripcionales de la familia Homeobox-leucine zipper (HD-ZIP). Además participa en la señalización mediada por ABA y en la respuesta a estrés abiótico (Yan *et al.*, 2016). Las plantas de *A. thaliana* con acumulación reducida de miR165/166 son resistentes a la sequía y durante la germinación son hipersensibles al ABA exógeno. Además, se ha demostrado que por miR165/166 regula la respuesta mediada por ABI4, un factor de transcripción de respuesta al ABA. Esto sugiere una profunda relación entre el ABA y el miR166, la cual desconocemos en *M. polymorpha*. La relación entre esta información encontrada en la literatura y los experimentos realizados son los cambios morfológicos que experimenta el talo con el tratamiento de ABA exógeno, donde se observaron rizoides en la epidermis superior del talo.

El miR319 regula factores tipo TCP y el miR159 regula factores tipo MYB en *A. thaliana*, miR159 es evolutivamente derivado de miR319 (Garcias-Morales, 2016) por lo que están íntimamente relacionados. miR159 se acumula diferencialmente en respuesta al tratamiento con ABA exógeno en *A. thaliana* (Reyes y Chua, 2007) y en consecuencia sus blancos (como MYB33) son afectados por ABA, lo que sugiere que esta fitohormona afecta este módulo de regulación. En otras plantas modelo, se ha documentado una relación directa de miR319 con el ABA, Joshi *et al.*, (2021) identificaron elementos regulatorios de respuesta a ABA en el promotor de miR319 en *Brassica juncea*. Esto sugiere que en diferentes linajes la respuesta mediada por miRNAs puede diversificarse.

El miR529, regula un subgrupo de mRNAs regulados por miR156 y se ha determinado recientemente que el factor de transcripción SPL9 que regula, incrementa la respuesta a ABA uniéndose directamente a los promotores de los genes de respuesta a ABA (Dong *et al.*, 2021). Aunque no hay evidencia a cerca de esta relación con miR529, estos dos miRNAs actúan sobre el mismo tipo de mRNAs blanco, por lo que podría existir esta relación que aún no se describe.

### **7.3 Participación de los miRNAs en respuesta al estrés salino en *M. polymorpha*.**

Durante los tratamientos de estrés salino probados, no solo la planta sufre cambios a nivel morfológico y fisiológico, de acuerdo con la evidencia discutida hasta aquí. Todos estos eventos están relacionados con la respuesta molecular, el tercer pilar de la respuesta al estrés (Madhava Rao *et al.*, 2006, sección 1.3.1). Se corroboró el efecto a nivel molecular de los tratamientos con NaCl 150 o 250 mM, a través de la acumulación del mRNA de la *LEA7*. Se encontró que la acumulación relativa del mRNA de la *MpLEA7* aumentó en talos expuestos a NaCl 150 y 250 mM (Figura 6.12), lo cual sugiere que los posibles mecanismos de respuesta a estrés hídrico están activos en talos expuestos a estas condiciones, lo que es consistente con las evidencias morfológicas y fisiológicas presentadas.

La *LEA7* es un marcador molecular de la respuesta a estrés debido a que se ha documentado ampliamente que se acumula en respuesta a diferentes tipos de estrés y es una proteína asociada a las estructuras de las plantas donde el agua es limitada, como lo es el polen y la semilla (Covarrubias *et al.*, 2020). Incluso, se ha documentado en plantas vasculares y no vasculares que las *LEA*, se acumulan en el tejido vegetativo de plantas expuestas a estrés osmótico (Akter *et al.*, 2014; Bhardwaj *et al.*, 2013). En *Arabidopsis thaliana* las *LEAs* se dividen en 7 grupos debido a características en su secuencia (Battaglia y Covarrubias, 2013). La *LEA7*, pertenece al grupo III, este grupo se caracteriza por un dominio específico de 11 residuos de aminoácidos y se sabe que participan en la respuesta a la deshidratación reduciendo la agregación de otras proteínas (Bhardwaj *et al.*, 2013). Ya que las condiciones de estrés analizadas implicaron la pérdida de agua (Figura 6.5) es posible inferir que la participación de esta *LEA* está ligada a la protección de otras proteínas en contra de los efectos osmóticos causados por el medio salino.

El modelo más sencillo de participación de los miRNAs en la respuesta al estrés es su regulación a nivel global, ya que las condiciones ambientales pueden afectar la vía de síntesis de los miRNAs y la síntesis o actividad de los efectores mediante los cuales los miRNAs inhiben sus mRNAs blanco, implicando a su vez, cambios a gran escala en las poblaciones de los miRNAs en general. Esto ha sido propuesto previamente en la literatura,

aunque existen pocos ejemplos que demuestran que el mRNA de *DCLI* o el de *AGO1* se acumulan diferencialmente en respuesta a estrés. Por ejemplo, en plantas de la leguminosa de *M. truncatula*, sometidas a sequía moderada o severa, se encontró que la acumulación de los transcritos de *DCLI* y *AGO1* aumenta en el tallo y sobre todo en la raíz (Capitão *et al.*, 2011). En Chile (*Capsicum annuum* L), el tratamiento con polietilenglicol (PEG) y la exposición a frío indujeron la acumulación del mRNA de *AGO1* y *DCLI* (Qin *et al.*, 2018). En el pasto *Saccharum spontaneum*, el tratamiento con PEG indujo la acumulación del mRNA de *DCLI* en hojas (Cui *et al.*, 2020). Sin embargo, la vía de regulación postranscripcional mediada por miRNAs y su relación con la respuesta a estrés es un campo en exploración en diversas plantas y poco se conoce en *M. polymorpha*.

En los experimentos llevados a cabo en este proyecto, se encontró que disminuyó significativamente la acumulación del mRNA de *DCLI*, en talos expuestos a NaCl 250 mM. Sin embargo, al observar los datos del análisis de expresión diferencial de los miRNAs obtenidos mediante secuenciación masiva, se observó que la acumulación de estos miRNA no disminuye de manera global en el tratamiento con NaCl 250 mM ya que de acuerdo con la Tabla 6.3 los miRNAs se acumularon diferencialmente tanto incrementándose como disminuyendo en respuesta a los tratamientos de NaCl analizados. Cabe señalar que, en los talos expuestos a 250 mM de NaCl, se encontraron sólo 50 miRNAs a diferencia de los 60 miRNAs observados en talos control (Tabla 6.2). A pesar de los cambios observados en la acumulación de DCL de este trabajo y los cambios reportados por otros autores (Capitão *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2018), es difícil concluir que la respuesta mediada por miRNAs se lleve a cabo de manera global, más bien parece ser independiente para cada miRNA.

La disminución en la acumulación del mRNA de la DCL1 y el menor número de miRNAs en los talos tratados con NaCl 250 mM, son eventos que pueden estar correlacionados entre sí, pero, pueden estar correlacionadas a su vez a las consecuencias del daño general en los talos (Figura 6.1). Hay diferentes factores que afectan la acumulación y la vida media de las especies de RNA en la célula. La degradación y la síntesis se equilibran para mantener la población observada de RNAs cuando analizamos un momento y condición específica. Por esto a pesar de observar un cambio en DCL1 en los talos tratados con NaCl 250 mM, es posible observar cambios distintos en los miRNAs encontrados, debido a que la

población de cada uno es afectada por diversos factores además de su producción mediante DCL1. Estos resultados indican que la regulación de los miRNAs no es global.

Mediante el análisis de secuenciación masiva, se encontraron 60 miRNAs, 59 de los cuales se expresan diferencialmente acorde a una normalización realizada mediante comparaciones pareadas con las secuencias encontradas en talos tratados con medio control. Sólo miR11677 no cambia respecto a control en ninguna de las dos bibliotecas. En la biblioteca control, se encontraron 59 miRNAs en el análisis pareado respecto a 150 mM de NaCl. Se identificaron 56 miRNAs en los talos tratados con NaCl 150 mM y 50 miRNAs en los talos tratados con NaCl 250 mM. Esto sugiere que la mayoría de los miRNAs encontrados se acumulan diferencialmente en ambas condiciones.

Considerando las características de la base de datos de miRNAs diferencialmente expresados, para escoger los miRNAs a analizar mediante RT-qPCR, la estrategia fue escoger preferiblemente miRNAs conservados con otras plantas, y/o que ya se tuviera evidencia de que eran detectables en *M. polymorpha*.

Aunque existe un grupo amplio de microRNAs de *M. polymorpha* que se conserva a lo largo de las plantas terrestres (Tabla 2.1), en las muestras analizadas únicamente se identificaron dos miRNAs que se conservan en el clado Embriophyta, el miR166 y el miR159/319. En los análisis mediante RT-qPCR se incluyó al miR529, que a pesar de no encontrarse mediante el análisis de secuenciación es un miRNA conservado que se acumula en *M. polymorpha* (Reyes-Taboada, datos no publicados) y que se sabe que participa en la respuesta a estrés en plantas vasculares. El miR529 se conserva en otros clados, incluyendo briofitas, licopodios y monocotiledóneas (Cuperus *et al.*, 2011). Los miRNAs no conservados analizados fueron miR11732, miR11742, miR11753. A pesar de que todos fueron identificados por secuenciación masiva, no se pudo cuantificar al miR11732, el cual, según los datos de secuenciación disminuye 0.09 veces en los talos expuestos a 150 mM de NaCl (FC=11.35), y este cambio tiene un valor estadístico muy cercano al valor de *p* significativo (*p-value*=0.067), lo que sugiere que se acumula lo suficiente para ser detectado en talos control y tratados. Esto expone de manera contundente la debilidad del análisis de expresión diferencial por sí solo. Para estos análisis se debió de dar mayor peso al número de lecturas normalizadas en las que estaba basado el FC observado. Por ejemplo, en el caso de

miR11732, el FC de 11.35 con p-value= 0.067, sin embargo, está basado únicamente en 2 lecturas en la biblioteca de NaCl 150 mM y 8 en la de 250 mM. Ya que puede resultar útil considerar estos datos en experimentos subsecuentes, se agregó en el anexo E la lista de miRNAs y el número de lecturas reportado para cada uno en los análisis pareados a modo de mapa de calor. Considerando que los miRNAs de interés para evaluar mediante RT-qPCR pudieran ser los que tienen un mayor número de lecturas normalizadas, el anexo E sugiere al miR11666, miR11669, miR11672, miR11677, miR11693, miR11715, miR11731, miR11756, miR11768. Estos miRNAs son interesantes para ser considerados como blancos de estudio en el futuro.

A pesar de estas consideraciones *a priori* y *a posteriori*, el análisis de datos mediante RT-qPCR proporcionó interesantes hallazgos. Los miRNAs evaluados mediante RT-qPCR (Tabla 6.4), se presentaron en dos grupos, los miRNAs conservados en las plantas terrestres (miR166, miR319 y miR529) y los miRNAs no conservados en las plantas terrestres (miR11753, miR11742 y miR11532), y que sólo se encuentran en *M. polymorpha*. Esto último se corroboró mediante análisis tipo BLAST (Altschul, 1997), comparando las secuencias de los miRNAs exclusivos de *M. polymorpha* con los 260 genomas de plantas terrestres disponibles en la base de datos de Phytozome (ANEXO D).

El miR166 se ha identificado en plantas vasculares y no vasculares (Tabla 2.1). Su blanco de regulación son mRNAs de FTs tipo Class III HOMEODOMAIN LEUCINE-ZIPPER (HD-ZIP III) y se ha descrito su participación en la respuesta a estrés mediada por ABA a través de la regulación de estos factores de transcripción en *A. thaliana* (Yan *et al.*, 2016). A pesar de que los datos de secuenciación masiva indicaron una disminución en la acumulación del miR166 en los talos expuestos a NaCl 150 o 250 mM, y que el cambio esperado era consistente entre las dos condiciones, este resultado no se confirmó por el análisis mediante RT-qPCR. Se considera que el miR166 es una de las familias con más miembros de acuerdo con miRBase (Li *et al.* 2017). Esta familia de factores de transcripción participa en diversos procesos del desarrollo como el desarrollo del meristemo apical del tallo (SAM), la polaridad de los órganos, el desarrollo de la semilla, el patrón vascular del tallo entre otros aspectos.

De acuerdo con Yan *et al.*, (2016), en *A. thaliana*, es necesario que miR165/166 disminuya para que la planta responda al estrés abiótico, de hecho, la mutante STTM165/166 que tiene niveles reducidos de acumulación de este miRNA tiene un fenotipo de resistencia a la sequía y al frío. La respuesta de *M. polymorpha* es distinta de estas observaciones, ya que es una planta no vascular con una fisiología distinta y a que el tipo de estrés es distinto. En el musgo en *P. patens* se ha caracterizado la función de los miembros de la familia HD-ZIP III en su desarrollo y se ha corroborado que los 5 miembros de la familia en *P. patens* son blanco de miR166 (Yip, *et al.* 2016), permitiendo inferir la participación de este miRNA en el desarrollo de esta briofita. Tomando esto en consideración, resulta un tema de interés continuar con la caracterización de miR166 y sus blancos en *M. polymorpha* probando otras condiciones de estrés en estudios futuros.

En general, la falta de concordancia entre la expresión diferencial sugerida por el análisis de secuenciación masiva y la acumulación diferencial evaluada mediante RT-qPCR, puede deberse a dos razones: 1) la baja confianza estadística asociada al análisis de expresión diferencial de la secuenciación masiva, la cual a su vez se debe al que se realizó con solo el 10% de las secuencias necesarias y 2) El análisis de expresión diferencial mediante secuenciación masiva, normaliza los datos respecto al tamaño de las bibliotecas comparadas, es decir al total de secuencias analizadas. En contraste, los análisis de RT-qPCR son comparaciones relativas a la acumulación de un gen endógeno y se representan respecto a la acumulación control.

En particular, en el análisis de miR166, a la cuantificación mediante RT-qPCR tiene un error estándar muy grande. Analizando de cerca los datos, se observó que en la réplica dos, la acumulación de miR166 varió en talos control respecto a su acumulación en los otros grupos control. Ampliar el número de replicas permitiría conocer el comportamiento de este miRNA en la población y reducir el efecto de los factores que no se pudieron controlar.

El miR529 no se identificó mediante secuenciación masiva, pero se sabe que se expresa en el talo de *M. polymorpha*. Este miRNA se encuentra presente desde las briofitas hasta las monocotiledóneas, pero no en las eudicotiledóneas y comparte gran similitud en su secuencia con miR156 (Morea *et al.*, 2016). La familia del miR529/miR156 regula factores de transcripción tipo SPL, los cuales participan en el desarrollo y se ha descrito que, en otras

plantas, responden a factores de estrés abiótico como sal, estrés osmótico y a la fitohormona ABA (Arshad *et al.*, 2017; Feyissa *et al.*, 2019; Morea *et al.*, 2016). Los resultados del análisis mediante RT-qPCR, indicaron que el miR529 no se acumula diferencialmente en respuesta a los tratamientos con NaCl. Los FTs tipo SPL, están presentes desde las algas verdes hasta las plantas con flor. Se ha demostrado que en las eudicotiledóneas se ha perdido la regulación mediada por miR529 donde estos factores de transcripción son regulados por miR156. Estos factores de regulación participan en las plantas en eventos claves del desarrollo, como la regulación del tiempo de floración y la ramificación, entre otros (Morea *et al.*, 2016). Sin embargo, no se han estudiado en *M. polymorpha*. Ya que en las condiciones estudiadas no se observó un cambio significativo de acuerdo con la prueba de ANOVA de una vía, es posible que participe en otras condiciones de estrés.

El miR319 se conserva en plantas vasculares y no vasculares, comparte 17 de 21 nucleótidos con miR159. En *Arabidopsis*, el miR319 regula factores tipo TCP y miR159 regula factores tipo MYB a pesar de su alto grado de identidad (Shih-Shun Lin y Bowman, 2018). Esto se debe a la especificidad de secuencia en los sitios de reconocimiento y a la regulación de la expresión de los miRNAs y sus blancos respectivos (Palatnik *et al.*, 2007). Se considera que miR159 derivó evolutivamente de miR319 ya que miR319 se conserva desde las plantas terrestres no vasculares hasta las plantas con flor y miR159 aparece a partir del grupo de los licopodios (planta vascular) (Axtell *et al.*, 2007). En *M. polymorpha* el miR319 regula a miembros de la familia de factores de transcripción tipo MpRKD y tipo MpMYB (Tabla 2.1) (Garcias-Morales, 2016), y se ha documentado que participa en procesos del desarrollo (Nag *et al.*, 2009). Por esto, resultó interesante saber si participa en la respuesta a estrés mediado por NaCl, donde se observó disminución en el tamaño, daño celular, incluso regiones con crecimiento anómalo, adyacentes a los tejidos dañados (Figura 6.1 H).

De acuerdo con los datos de secuenciación se esperaba que la acumulación de miR319 se incrementara en los talos tratados con NaCl 150 o 250 mM. A pesar de la baja confianza estadística sobre la expresión diferencial de miR319 (p-value=0.75), los datos obtenidos mediante RT-qPCR corroboraron que su acumulación aumenta significativamente en talos

expuestos a 150 mM, aunque no se observó que incrementara su acumulación en los talos tratados con NaCl 250 mM, pero si una tendencia de incremento. Se encontró que, en ambos tratamientos con NaCl, la acumulación de los mRNAs blanco de MpRKD y MpMYB33 disminuyen significativamente.

En *M. polymorpha* se ha demostrado que el factor de transcripción MpRKD participa en la reproducción sexual, ya que es necesario para la formación de los gametos, el oogonio y los anterozoides (Koi *et al.*, 2016) y se expresa preferencialmente en las estructuras de reproducción sexual, pero se ha demostrado que se acumula en gemas y talos de 7 y 14 días de edad (Garcias-Morales, 2016). Esto sugiere que MpRKD puede participar en otros procesos en el talo, sin embargo, mutantes de pérdida de función presentan un desarrollo normal del talo, excepto por la especificación de los gametos (Koi *et al.*, 2016). MYB33 se expresa en gemas y talos de *M. polymorpha* (Garcias-Morales, 2016) y es regulado por miR159 en *A. thaliana*, sin embargo, la regulación mediada por miR319 parece ser el sistema plesiomórfico (Garcias-Morales, 2016; Palatnik *et al.*, 2007). MYB33 participa en el desarrollo de las estructuras de reproducción sexual masculina, en diferentes plantas como *Selaginella moellendorffii*, *P. patens* y *A. thaliana* (Garcias-Morales, 2016; Millar *et al.*, 2019).

De acuerdo con la literatura, MYB33 y RKD, participan principalmente en la reproducción sexual en *M. polymorpha*, sin embargo, se acumula en el tejido vegetativo analizado (talos) y su acumulación responde a la acumulación de miR319 durante las condiciones de estrés salino analizadas. Los ensayos de sobreexpresión de miR319 realizados por Garcias-Morales, sugirieron que este miRNA tiene un importante rol en el desarrollo del talo ya que la sobreexpresión de este miRNA afecta su desarrollo normal. En este panorama, este módulo de regulación miR319/RKD-MYB33 podría regular el crecimiento y/o patrón de desarrollo del talo durante la respuesta a estrés salino. Los efectos del estrés en el crecimiento y el desarrollo han sido documentados en la literatura (Redondo-Gómez, 2013). Se ha propuesto de manera general que el estrés abate el crecimiento global en plantas pero lo acelera a nivel local (por ejemplo meristemas) (Madhava Rao *et al.*, 2006). Tal vez este módulo de regulación puede participar en la regulación de la morfogénesis del talo en respuesta a estrés, sin embargo, esto debe ser analizado y probado para determinar cuál es el papel de estos dos mRNAs blanco de miR319 en la respuesta a estrés salino

En cuanto a los miRNAs de *M. polymorpha*, no conservados con otras plantas, se encontró que el miR11732 no pudo ser cuantificado mediante RT-qPCR pese a que el análisis de la secuenciación masiva indicó que la acumulación del disminuyó 11.35 veces en talos expuestos a NaCl 150 mM, y 1.18 veces en talos expuestos a NaCl 250 mM. Se observó mediante RT-qPCR que el miR11742 disminuyó significativamente en los talos expuestos a NaCl 150 mM y que hay una tendencia similar en los talos expuestos a NaCl 250 mM. Esto se opone totalmente a los datos de secuenciación que sugerían que este miRNA aumenta en respuesta a estrés salino. Por otro lado, No se observó una diferencia significativa en la acumulación del miR11753, sin embargo, se acumuló con una tendencia a incrementarse en respuesta a NaCl, esta tendencia no fue significativa debido a que el error estándar es muy grande, y nuevamente esta variabilidad se debe a que, en una de las réplicas independientes, la muestra control indica valores de CT distintos para este miRNA. No se tiene evidencia de mRNAs blanco posibles para miR11742 ni miR11753.

Ya que miR11742a disminuye significativamente en los talos tratados con 150 mM de NaCl, se realizó un breve acercamiento para encontrar los posibles blancos de este miRNA en el genoma de *M. polymorpha* mediante la herramienta psRNATarget (Dai *et al.*, 2018). Con esta herramienta, se predijeron 2 genes de *M. polymorpha* cuyos transcritos pueden ser blancos potenciales de este miRNA, al tener una alta complementariedad (*expectation*  $\leq 3$ ) estos son: Mapoly0076s0039.1 que de acuerdo con el sistema de clasificación PANTHER (Thomas *et al.*, 2003) puede ser una CINASA SERINA/TREONINA y el Mapoly0086s0087.1 cuya secuencia no está asociada a ninguna entrada registrada en InterPro (sistema de clasificación de proteínas). La confirmación y estudio de estos posibles blancos será de interés para continuar con el estudio de la respuesta a estrés por NaCl en *M. polymorpha*.

En este trabajo fue posible observar la respuesta de *M. polymorpha* a estrés salino empleando distintos enfoques. Este modelo ha crecido increíblemente rápido en los últimos años debido a su posición filogenética, su ciclo de vida corto, su reproducción asexual que permite la expansión clonal del talo, su genoma pequeño y poco redundante entre otras características que lo han vuelto un sistema atractivo y que ahora tras pocos años de tener su genoma secuenciado ha permitido abordar muchas preguntas acerca de la biología vegetal

(Bowman *et al.*, 2022). No obstante, tiene algunas limitaciones que han sido un reto y motivo de aprendizaje. En particular, ha resultado un modelo complicado debido a que los talos son muy sensibles a la deshidratación. Esto fue un reto particular en el momento de estimar la tasa fotosintética. Sin embargo, resultó ser un modelo noble para el estudio del efecto del medio salino ya que los experimentos fueron reproducibles y los talos se mantuvieron viables durante los mismos.

## 8 Conclusiones

- Los tratamientos con NaCl 150 o 250 mM constituyen condiciones de estrés que generan cambios a nivel morfológico, fisiológico y molecular en el talo de *M. polymorpha*.
  - Los cloroplastos se relocalizaron en la periferia celular, debido posiblemente al crecimiento de la vacuola.
  - Los talos expuestos a estrés salino moderado (NaCl 150 mM) y severo (NaCl 250 mM) se deshidrataron.
  - El potencial osmótico celular se mantuvo constante durante estrés salino moderado (NaCl 150 mM) y disminuyó durante un tratamiento de estrés salino severo (NaCl 250 mM).
  - La fotosíntesis evaluada a través de la asimilación del carbono se mantuvo activa durante la exposición a estrés salino moderado (NaCl 150 mM), pero se inhibió durante la exposición a estrés salino severo (NaCl 250 mM)
  - La exposición a ABA indujo la relocalización de los cloroplastos, pero no afectó la tasa fotosintética ni el potencial osmótico. Experimentos independientes sugirieron que el crecimiento de la vacuola es mediado por ABA.
  - El pretratamiento con ABA protegió los talos expuestos a NaCl 150 mM contra los efectos observados en la región central del talo.
  - Los tres tratamientos inducen la acumulación del mRNA de la MpLEA7, un marcador molecular de estrés.
- El mecanismo de regulación postranscripcional de la expresión genética mediado por miRNAs participa en la respuesta a estrés salino en *M. polymorpha*:
  - La evidencia indica que la regulación mediada por miRNAs no respondió de manera global a través de cambios en la acumulación de los transcritos de *AGO1* y *DCL1*, sino que respondió a través de la acumulación diferencial de

miRNAs particulares y que la acumulación fue sensible a la severidad del estrés salino.

- Mediante secuenciación masiva, se encontraron 60 miRNAs que se acumularon diferencialmente en respuesta a estrés salino.
- Se corroboró mediante RT-qPCR que 2 de 6 miRNAs evaluados, se acumularon diferencialmente en respuesta al tratamiento con NaCl 150 mM.
- El análisis de la acumulación relativa del miR319 y de los mRNAs de sus blancos, MpMYB33 y MpRKD, sugiere que este miRNA participa en la respuesta a estrés salino en *M. polymorpha*, aunque su rol en tejidos vegetativos puede ser distintito del papel en el que participa durante los procesos de reproducción sexual en los que se ha encontrado asociado.

## 9 Perspectivas

- Explorar el papel del módulo miR319-RKD/MYB 33 en la respuesta a estrés salino y evaluar si está regulado por ABA.
- Validar los posibles blancos de miR11742 y explorar su acumulación en respuesta a NaCl.
- Explorar otros miRNAs que responden a NaCl tomando en cuenta el número de lecturas que soportan el análisis de expresión diferencial.

## 10 Referencias

- Akter, K., Kato, M., Sato, Y., Kaneko, Y., y Takezawa, D. (2014). Abscisic acid-induced rearrangement of intracellular structures associated with freezing and desiccation stress tolerance in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Journal of Plant Physiology*, 171(15), 1334–1343.
- Alaba, S., Piszczalka, P., Pietrykowska, H., Pacak, A. M., Sierocka, I., Nuc, P. W., Singh, K., *et al.* (2015). The liverwort *Pellia endiviifolia* shares microtranscriptomic traits that are common to green algae and land plants. *New Phytologist*, 206(1), 352–367.
- Alpert, P. (2000). The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology*, 151(1), 5–17.
- Althoff, F., Kopischke, S., Zobell, O., Ide, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., y Zachgo, S. (2014). Comparison of the MpEF1 $\alpha$  and CaMV35 promoters for application in *Marchantia polymorpha* overexpression studies. *Transgenic Research*, 23(2), 235–244.
- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Arroyo, I. A. (2012). *Caracterización fenotípica de mutantes en genes para proteínas LEA de la familia 6 en respuesta a déficit hídrico en Arabidopsis thaliana*.
- Arshad, M., Gruber, M. Y., Wall, K., y Hannoufa, A. (2017). An Insight into microRNA156 Role in Salinity Stress Responses of Alfalfa. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Axtell, M. J., Snyder, J. A., y Bartel, D. P. (2007). Common functions for diverse small RNAs of land plants. *The Plant cell*, 19(6), 1750–1769.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., y Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, 12(4), 221.
- Battaglia, M., y Covarrubias, A. A. (2013). Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcíarrubio, A., Campos, F., y Covarrubias, A. A. (2008). The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), 6–24.
- Bhardwaj, R., Sharma, I., Kanwar, M., Sharma, R., Handa, N., Kaur, H., Kapoor, D., *et al.* (2013). LEA Proteins in Salt Stress Tolerance. *Salt Stress in Plants* (pp. 79–112).
- Bologna, N. G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., *et al.* (2018). Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, 69(4), 709-719.e5.
- Bowman, J. L. (2016). A Brief History of *Marchantia* from Greece to Genomics. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 210–229.
- Bowman, J. L., Arteaga-Vazquez, M., Berger, F., Briginshaw, L. N., Carella, P., Aguilar-Cruz, A., Davies, K. M., *et al.* (2022). The renaissance and enlightenment of *Marchantia* as a model system. *The Plant Cell*, 34(10), 3512–3542.
- Bowman, J. L., Floyd, S. K., y Sakakibara, K. (2007). Green Genes—Comparative Genomics of the Green Branch of Life. *Cell*, 129(2), 229–234.
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., *et al.* (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome.

*Cell*, 171(2), 287-304.e15.

- Bray, E. A. E. A. E. A., Leone, A., Al., E., Kahn, T. L., Al., E., Abad, L. R., Al., E., *et al. et al.* (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2), 48–54.
- Buck, W. R., Shaw, A. J., y Goffinet, B. (2008). Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. En A. J. Shaw (Ed.), *Bryophyte Biology* (Vol. 88, pp. 55–138).
- Capitão, C., Paiva, J. A., Santos, D. M., y Fevereiro, P. (2011). In *Medicago truncatula*, water deficit modulates the transcript accumulation of components of small RNA pathways. *BMC Plant Biology*, 11(1), 79.
- Castro-Camus, E., Palomar, M., y Covarrubias, A. A. (2013). Leaf water dynamics of *Arabidopsis thaliana* monitored in-vivo using terahertz time-domain spectroscopy. *Scientific Reports*, 3(1), 2910.
- Chang, Y., y Graham, S. W. (2011). Inferring the higher-order phylogeny of mosses (Bryophyta) and relatives using a large, multigene plastid data set. *American Journal of Botany*, 98(5), 839–849.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., *et al. et al.* (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*, 33(20), e179.
- Cheng, S., Huang, Y., Zhu, N., y Zhao, Y. (2014). The rice WUSCHEL-related homeobox genes are involved in reproductive organ development, hormone signaling and abiotic stress response. *Gene*, 549(2), 266–274.
- Covarrubias, A. A., y Reyes, J. L. (2010). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 481–489.
- Covarrubias, A. A., Romero-Pérez, P. S., Cuevas-Velazquez, C. L., y Rendón-Luna, D. F. (2020). The functional diversity of structural disorder in plant proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 680, 108229.
- Crandall-Stotler, B., Stotler, R. E., y Long, D. G. (2009). Phylogeny and classification of the Marchantiophyta. *Edinburgh Journal of Botany*, 66(1), 155–198.
- Cuevas-Velazquez, C. L., Reyes, J. L., y Covarrubias, A. A. (2017). Group 4 late embryogenesis abundant proteins as a model to study intrinsically disordered proteins in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 12(7), e1343777.
- Cui, D.-L., Meng, J.-Y., Ren, X.-Y., Yue, J.-J., Fu, H.-Y., Huang, M.-T., Zhang, Q.-Q., *et al. et al.* (2020). Genome-wide identification and characterization of DCL, AGO and RDR gene families in *Saccharum spontaneum*. *Scientific Reports*, 10(1), 13202.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., y Carrington, J. C. (2011). Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. *The Plant Cell*, 23(2), 431–442.
- Dai, X., Zhuang, Z., y Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W49–W54.
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., y Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6), 371–379.
- Dong, H., Yan, S., Jing, Y., Yang, R., Zhang, Y., Zhou, Y., Zhu, Y., *et al.* (2021). MIR156-Targeted SPL9 Is Phosphorylated by SnRK2s and Interacts With ABI5 to Enhance ABA Responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 12.

- Evans, J. R., y Santiago, L. S. (2014). PrometheusWiki Gold Leaf Protocol: gas exchange using LICOR 6400. *Functional Plant Biology*, 41(3), 223.
- Feyissa, B. A., Arshad, M., Gruber, M. Y., Kohalmi, S. E., y Hannoufa, A. (2019). The interplay between miR156/SPL13 and DFR/WD40-1 regulate drought tolerance in alfalfa. *BMC Plant Biology*, 19(1), 434.
- Flores-Sandoval, E., Romani, F., y Bowman, J. L. (2018). Co-expression and Transcriptome Analysis of *Marchantia polymorpha* Transcription Factors Supports Class C ARFs as Independent Actors of an Ancient Auxin Regulatory Module. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Gaff, D. F., y Okong'O-Ogola, O. (1971). The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *Journal of Experimental Botany*, (22), 756–758.
- Gaff, Donald F., y Oliver, M. (2013). The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Functional Plant Biology*, 40(4), 315.
- Garcias-Morales, D. (2016). Identificación y caracterización de Mpo-mir319 un microRNA conservado en el linaje de las plantas terrestres.
- Ghorecha, V., Patel, K., Ingle, S., Sunkar, R., y Krishnayya, N. S. R. (2014). Analysis of biochemical variations and microRNA expression in wild (*Ipomoea campanulata*) and cultivated (*Jacquemontia pentantha*) species exposed to in vivo water stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(1), 57–67.
- Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P., *et al.* (2010). Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*, 16(5), 991–1006.
- Glime, J. M., y Bisang, I. (2013). Physiological ecology. *Bryophyte Ecology*.
- Godinez-Vidal, D., López-Leal, G., Covarrubias, A. A., y Reyes, J. L. (2020). Early events leading to water deficit responses in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Environmental and Experimental Botany*, 178, 104172.
- Goffinet, B. (2008). *Bryophyte Biology*. (A. J. Shaw, Ed.) (Second.).
- Graham, L. K. E., y Wilcox, L. W. (2000). The origin of alternation of generations in land plants: a focus on matrotrophy and hexose transport. (D. Edwards, D. J. Read, y J. G. Duckett, Eds.) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1398), 757–767.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S., y Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*.
- Ha, M., y Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524.
- Hannon lab public galaxy. (2016). FASTX-Toolkit. 2010. Recuperado a partir de [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)
- He, F., Xu, C., Fu, X., Shen, Y., Guo, L., Leng, M., y Luo, K. (2018). The MicroRNA390 / TRANSACTING SHORT INTERFERING RNA3 Module Mediates Lateral Root Growth under Salt Stress via the Auxin Pathway. *Plant Physiology*, 177(2), 775–791.
- Hoth, S. (2002). Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell*

- Science*, 115(24), 4891–4900.
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K. T., y Kohchi, T. (2008). Agrobacterium-Mediated Transformation of the *Marchantia polymorpha* L., an Emerging Model for Plant Biology. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1084–1091.
- Joshi, G. A. nee, Chauhan, C., y Das, S. (2021). Sequence and functional analysis of MIR319 promoter homologs from Brassica juncea reveals regulatory diversification and altered expression under stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 296(3), 731–749.
- Karol, K. G. (2001). The Closest Living Relatives of Land Plants. *Science*, 294(5550), 2351–2353.
- Khandelwal, A., Cho, S. H., Marella, H., Sakata, Y., Perroud, P.-F., Pan, A., y Quatrano, R. S. (2010). Role of ABA and ABI3 in Desiccation Tolerance. *Science*, 327(5965), 546–546.
- Kimura, S., y Kodama, Y. (2016). Actin-dependence of the chloroplast cold positioning response in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *PeerJ*, 4, e2513.
- Klingler, J. P., Batelli, G., y Zhu, J.-K. (2010). ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3199–3210.
- Koi, S., Hisanaga, T., Sato, K., Shimamura, M., Yamato, K. T., Ishizaki, K., Kohchi, T., et al. (2016). An Evolutionarily Conserved Plant RKD Factor Controls Germ Cell Differentiation. *Current Biology*, 26(13), 1775–1781.
- Von Konrat, M., Soderstrom, L., Renner, M. A. M., Hagborg, A., Briscoe, L., y Engel, J. J. (2014). Early Land Plants Today (ELPT): How many liverwort species are there? *Phytotaxa*, 9(1), 22.
- Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 15(1), Unit 15.10.
- De la Rosa, C., Covarrubias, A. A., y Reyes, J. L. (2019). A dicistronic precursor encoding miR398 and the legume-specific miR2119 coregulates CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit. *Plant, Cell & Environment*, 42(1), 133–144.
- Lauressergues, D., Ormancey, M., Guillotin, B., San Clemente, H., Camborde, L., Dubo e, C., Tourneur, S., et al. (2022). Characterization of plant microRNA-encoded peptides (miPEPs) reveals molecular mechanisms from the translation to activity and specificity. *Cell Reports*, 38(6), 110339.
- Lee, S. C., y Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell & Environment*, 35(1), 53–60.
- Li, W.-X., Oono, Y., Zhu, J.-K. J., He, X.-J., Wu, J.-M., Iida, K., Lu, X.-Y., et al. (2008). The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. *The Plant Cell*, 20(8), 2238–2251.
- Light, M. E. (2013). The Molecular Life of Plants. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 75(2), 103–104.
- Ligrone, R., Duckett, J. G., y Renzaglia, K. S. (2012). Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. *Annals of Botany*, 109(5), 851–871.
- Lin, J.-S., Kuo, C.-C., Yang, I.-C., Tsai, W.-A., Shen, Y.-H., Lin, C.-C., Liang, Y.-C., et al. (2018). MicroRNA160 Modulates Plant Development and Heat Shock Protein Gene Expression to Mediate Heat Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Lin, P.-C., Lu, C.-W., Shen, B.-N., Lee, G.-Z., Bowman, J. L., Arteaga-Vazquez, M. A., Daisy Liu,

- L.-Y., *et al.* (2016). Identification of miRNAs and Their Targets in the Liverwort *Marchantia polymorpha* by Integrating RNA-Seq and Degradome Analyses. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 339–358.
- Lin, S.-S., y Bowman, J. L. (2018). MicroRNAs in *Marchantia polymorpha*. *New Phytologist*, 220(2), 409–416.
- Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., y Zheng, C.-C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14(5), 836–843.
- López-Galiano, M. J., García-Robles, I., González-Hernández, A. I., Camañes, G., Vicedo, B., Real, M. D., y Rausell, C. (2019). Expression of miR159 Is Altered in Tomato Plants Undergoing Drought Stress. *Plants*, 8(7), 201.
- Love, M. I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Lu, Y., Feng, Z., Liu, X., Bian, L., Xie, H., Zhang, C., Mysore, K. S., *et al.* (2018). MiR393 and miR390 synergistically regulate lateral root growth in rice under different conditions. *BMC Plant Biology*, 18(1), 261.
- Ma, C., Burd, S., y Lers, A. (2015). miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 84(1), 169–187.
- Madhava Rao, K. V, Raghavendra, A. S., y Janardhan Reddy, K. (Eds.). (2006). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*.
- Marchetti, F., Cainzos, M., Cascallares, M., Distéfano, A. M., Setzes, N., López, G. A., Zabaleta, E., *et al.* (2021). Heat stress in *Marchantia polymorpha*: Sensing and mechanisms underlying a dynamic response. *Plant, Cell & Environment*, 44(7), 2134–2149.
- McCarthy, D. J., y Smyth, G. K. (2009). Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*, 25(6), 765–771.
- Millar, A. A., Lohe, A., y Wong, G. (2019). Biology and Function of miR159 in Plants. *Plants*, 8(8), 255.
- Morea, E. G. O., da Silva, E. M., e Silva, G. F. F., Valente, G. T., Barrera Rojas, C. H., Vincentz, M., y Nogueira, F. T. S. (2016). Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. *BMC Plant Biology*, 16(1), 40.
- Nag, A., King, S., y Jack, T. (2009). miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22534–22539.
- Ogasawara, Y., Ishizaki, K., Kohchi, T., y Kodama, Y. (2013). Cold-induced organelle relocation in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant, Cell & Environment*, 36(8), 1520–1528.
- Oliver, M. J., Velten, J., y Mishler, B. D. (2005). Desiccation Tolerance in Bryophytes: A Reflection of the Primitive Strategy for Plant Survival in Dehydrating Habitats? *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 788–799.
- Palatnik, J. F., Wollmann, H., Schommer, C., Schwab, R., Boisbouvier, J., Rodriguez, R., Warthmann, N., *et al.* (2007). Sequence and Expression Differences Underlie Functional Specialization of *Arabidopsis* MicroRNAs miR159 and miR319. *Developmental Cell*, 13(1), 115–125.
- Pandey, S., Nelson, D. C., y Assmann, S. M. (2009). Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic

- Acid Receptors in Arabidopsis. *Cell*, 136(1), 136–148.
- Patade, V. Y., y Suprasanna, P. (2010). Short-term salt and PEG stresses regulate expression of MicroRNA, miR159 in sugarcane leaves. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 13(3), 177–182.
- Pence, V. C., Dunford, S. S., y Redella, S. (2005). Differential effects of abscisic acid on desiccation tolerance and carbohydrates in three species of liverworts. *Journal of Plant Physiology*, 162(12), 1331–1337.
- Proctor, M. C. F. (2014). The Diversification of Bryophytes and Vascular Plants in Evolving Terrestrial Environments. En D. T. Hanson y S. K. Rice (Eds.), *Photosynthesis in Bryophytes and Early Land Plants SE-4*, Advances in Photosynthesis and Respiration (Vol. 37, pp. 59–77).
- Proctor, M. C. F., Oliver, M. J., Wood, A. J., Alpert, P., Stark, L. R., Cleavitt, N. L., MishlerMichael, B. D., et al. (2007). Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *BioOne*, 110(4), 595–621.
- Qin, L., Mo, N., Muhammad, T., y Liang, Y. (2018). Genome-Wide Analysis of DCL, AGO, and RDR Gene Families in Pepper (*Capsicum Annuum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1038.
- Qiu, Y. L. (2008). Phylogeny and evolution of charophytic algae and land plants. *Journal of Systematics and Evolution*, 46(3), 287–306.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., y Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15(7), 395–401.
- Raven, P. H., Evert, R. F., y Eichhorn, S. E. (2013). *Biology of Plants* (8°).
- Redondo-Gómez, S. (2013). *Molecular Stress Physiology of Plants*. (G. R. Rout y A. B. Das, Eds.) *Molecular Stress Physiology of Plants*.
- Reyes, J. L., y Chua, N.-H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 49(4), 592–606.
- Romero Pérez, S. P. (2015). *Análisis de microRNAs específicos de leguminosas de respuesta a déficit hídrico en Medicago truncatula*.
- Seeve, C. M., Sunkar, R., Zheng, Y., Liu, L., Liu, Z., McMullen, M., Nelson, S., et al. (2019). Water-deficit responsive microRNAs in the primary root growth zone of maize. *BMC Plant Biology*, 19(1), 447.
- Shimamura, M. (2016). *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 230–256.
- Singh, K. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), 430–436.
- Solly, J. E., Cunniffe, N. J., y Harrison, C. J. (2017). Regional Growth Rate Differences Specified by Apical Notch Activities Regulate Liverwort Thallus Shape. *Current Biology*, 27(1), 16–26.
- Sosa-Valencia, G., Covarrubias, A. A., y Reyes, J. L. (2013). Signaling by MicroRNAs in Response to Abiotic Stress. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 1* (pp. 51–67).
- Spinedi, N., Storb, R., Aranda, E., Romani, F., Svriz, M., Varela, S. A., Moreno, J. E., et al. (2021). ROS-Scavenging Enzymes as an Antioxidant Response to High Concentration of Anthracene in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plants*, 10(7), 1478.

- Studholme, D. J. (2012). Deep sequencing of small RNAs in plants: applied bioinformatics. *Briefings in Functional Genomics*, 11(1), 71–85.
- Suetsugu, N., y Wada, M. (2007). Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biological Chemistry*, 388(9).
- Sunkar, R., Li, Y.-F., y Jagadeeswaran, G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 17(4), 196–203.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5ta ed.).
- Takenaka, M., y Ohyama, K. (2000). Aseptic culture and transformation of *Marchantia polymorpha*. *Protocols for Plant Genome Research*, 155–162.
- Takezawa, D., Komatsu, K., y Sakata, Y. (2011). ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *Journal of Plant Research*, 124(4), 437–453.
- Tanaka, H., Suzuki, R., Okabe, N., Suzuki, T., y Kodama, Y. (2018). Salinity stress-responsive transcription factors in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Biotechnology*, 35(3), 281–284.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., *et al.* (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research*, 13, 2129–2141.
- Tian, C., Zuo, Z., y Qiu, J.-L. (2015). Identification and Characterization of ABA-Responsive MicroRNAs in Rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(7), 393–402.
- Tsuzuki, M., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kurihara, Y., Matsui, M., Bowman, J. L., Kohchi, T., *et al.* (2016). Profiling and Characterization of Small RNAs in the Liverwort, *Marchantia polymorpha*, Belonging to the First Diverged Land Plants. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 359–372.
- Upadhyaya, H., Sahoo, L., Panda, S. K., Hrishikesh, Upadhyaya Lingaraj, S., y Kumar Panda, S. (2013). Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. En G. R. Rout y A. B. Das (Eds.), *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 179–192).
- Vaucheret, H. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Development*, 18(10), 1187–1197.
- Wada, M., Kagawa, T., y Sato, Y. (2003). Chloroplast Movement. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 455–468.
- Wang, X. F., y Zhang, D. P. (2007). Abscisic Acid Receptors: Multiple Signal-perception Sites. *Annals of Botany*, 101(3), 311–317.
- Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., *et al.* (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), E4859–E4868.
- Xia, J., Wang, X., Perroud, P.-F., He, Y., Quatrano, R., y Zhang, W. (2016). Endogenous Small-Noncoding RNAs and Potential Functions in Desiccation Tolerance in *Physcomitrella Patens*. *Scientific Reports*, 6(1), 30118.
- Yamaoka, S., Takenaka, M., Hanajiri, T., Shimizu-Ueda, Y., Nishida, H., Yamato, K. T., Fukuzawa, H., *et al.* (2004). A mutant with constitutive sexual organ development in *Marchantia polymorpha* L. *Sexual Plant Reproduction*, 16(5), 253–257.

- Yan, J., Zhao, C., Zhou, J., Yang, Y., Wang, P., Zhu, X., Tang, G., *et al.* (2016). The miR165/166 Mediated Regulatory Module Plays Critical Roles in ABA Homeostasis and Response in *Arabidopsis thaliana*. (H. Yu, Ed.) *PLOS Genetics*, *12*(11), e1006416.
- Yu, Y., Jia, T., y Chen, X. (2017). The ‘how’ and ‘where’ of plant micro RNAs. *New Phytologist*, *216*(4), 1002–1017.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., y Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4157–4168.

## Anexo A Medio de cultivo

Medio Gamborg's B5 (Kimitsune Ishizaki)

10X Gamborg's B5 stock	50.00 mL
<u>MES</u>	<u>0.50 g</u>
Aforar con dH <sub>2</sub> O	1000.00 mL

Ajustar a pH 5.5 con 1N KOH  
En 2 frascos aptos para autoclave, agregar 5g de  
Agar, y 500 mL de la solución preparada.  
Esterilizar a 120° C por 20 min

10X Gamborg's B5 stock

En el 70% del volumen total, agregar durante agitación, los siguientes ingredientes en orden:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	1.75 g
KNO <sub>3</sub>	25.00 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.34 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	2.50 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	1.50 g
EDTA-NaFe (III)	400.00 mg
Gamborg's B5 micro-elements	10.00 mL
<u>0.075% KI(solución)</u>	<u>10.00 mL</u>
Aforar con dH <sub>2</sub> O	1,000.00 mL

Disolver y guardar en tubos Falcon de 50 mL,  
Almacenarlos a -20° C

Gamborg's B5 micro elements (1,000X)

En el 70% del volumen total, agregar durante agitación, los siguientes ingredientes en orden:

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	25 mg
25 mg/mL of CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O solution 0.1 mL (2.5 mg CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O)	
25 mg/mL of CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O solution 0.1 mL (2.5 mg CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O)	
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	200 mg
MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	1 g
<u>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></u>	<u>300 mg</u>
Aforar con dH <sub>2</sub> O a	100 mL

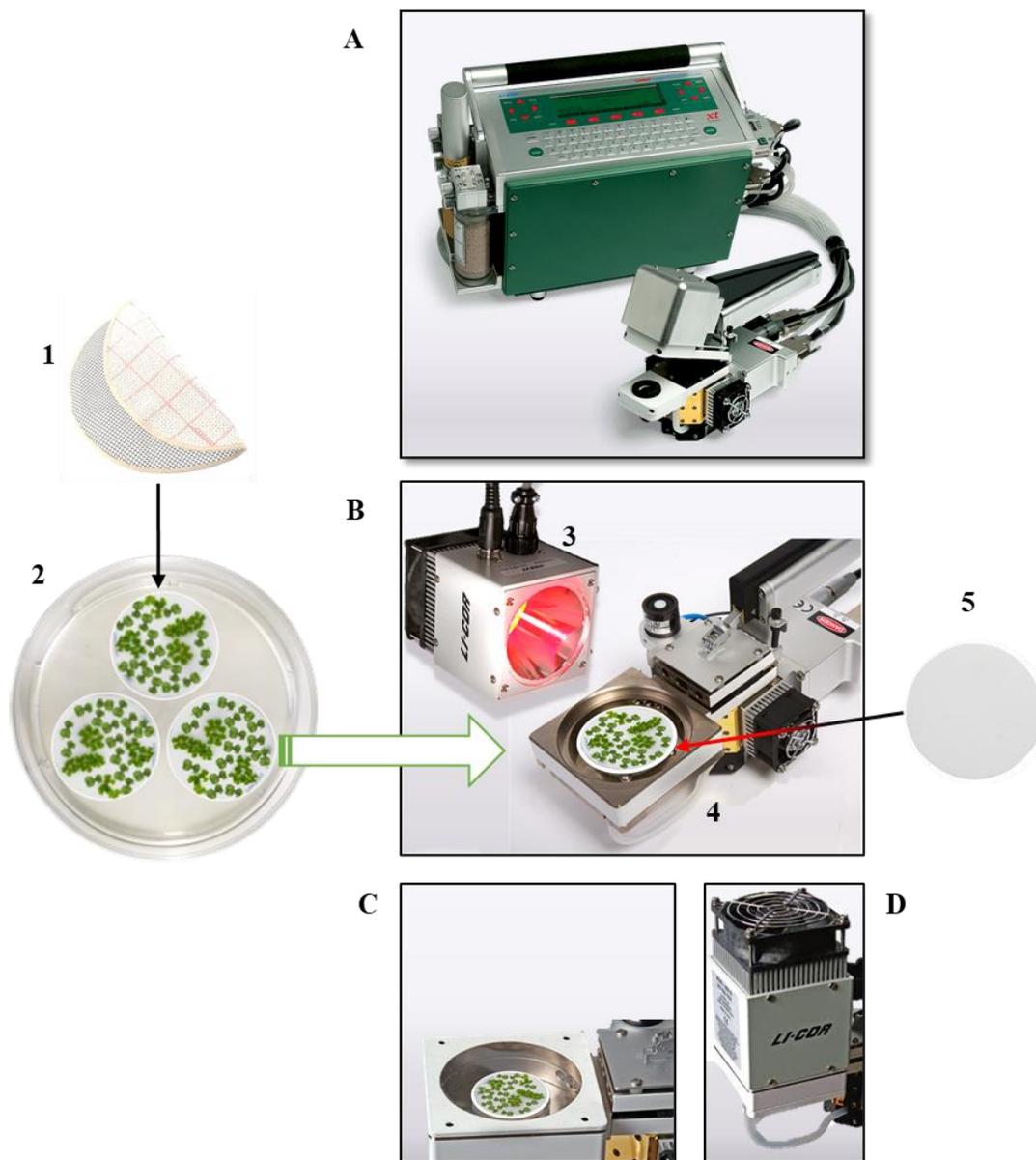
Guardar en tubos de 10 mL y congelar a -20° C.

0.075% KI (solución)	
<u>KI</u>	<u>75 mg</u>
Aforar con dH <sub>2</sub> O a	100 mL

Guardar en tubos de 10 mL y almacenar a -20° C.

## Anexo B Tasa fotosintética

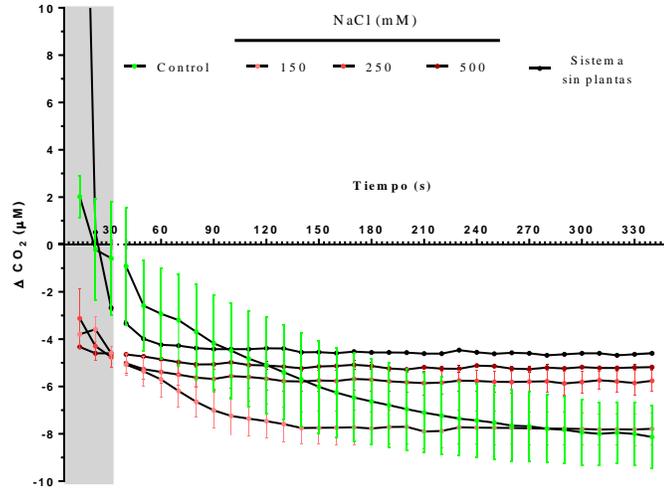
### I Sistema para evaluar la tasa fotosintética



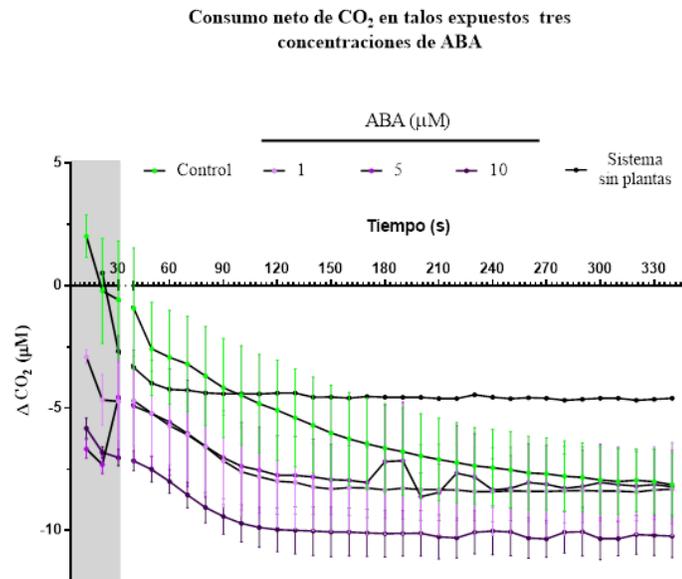
Se crecieron talos de *M. polymorpha* como se describe en la sección 5.2. Para los experimentos de fotosíntesis se crecieron 80 talos en círculos de organza (1) de alrededor de 4 cm de diámetro y se cultivaron en el medio de interés (2). Con el sistema LI-6400XT (A), se evaluó la tasa fotosintética usando la cámara de Briofitas (B). Se colocó un papel filtro (5) saturado con agua destilada sobre la rejilla de la cámara y luego se transfirieron los talos sobre la organza (4). Tras cerrar la cámara (C) se acopla la fuente de luz (3). La figura D ilustra el sistema cerrado donde se determina la tasa fotosintética.

## II Tasa de consumo de CO<sub>2</sub> (parte 1)

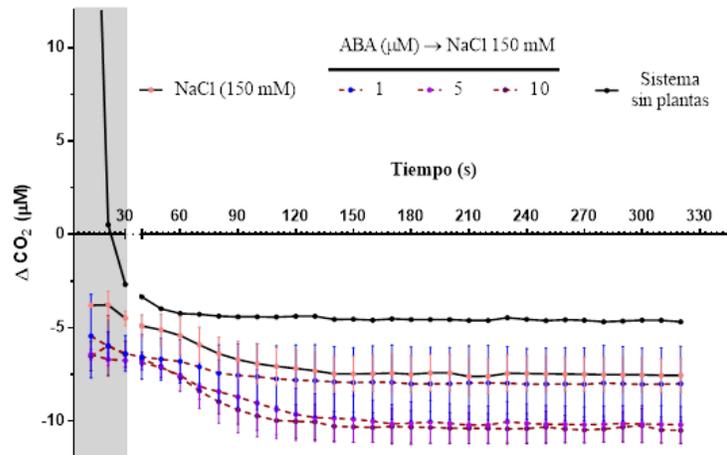
Consumo neto de CO<sub>2</sub> en talos expuestos a tres concentraciones de NaCl



## II Tasa de consumo de CO<sub>2</sub> (parte 2)



Consumo neto de CO<sub>2</sub> en talos tratados con tres concentraciones de ABA y luego expuestos a 150 mM de NaCl



## Anexo C Secuencia de los oligonucleótidos empleados

### I Oligonucleótidos usados para amplificar miRNAs

La siguiente tabla muestra el miRNA, y los oligonucleótidos usados para amplificarlo, el primer sentido, el oligonucleótido tallo-asa para la RT, y las secuencias de las figuras que ilustran un área común en todos los oligonucleótidos para la reacción RT. También se incluye la secuencia del oligonucleótido antisentido universal.

MiRNA y oligonucleótidos	Secuencia
<b>MpmiR11732</b>	5'-GTC CCT GAC TGC AAG ATG GGC-3'
<b>Sentido Tallo-asa RT</b>	5'-GTA TGT A GTG CTT GAC TGC AAG ATG GGC-3' TAC CCG  -3'
<b>MpmiR11753</b>	5'-TCT CGC GAA TCG GAT G GAA GGA-3'
<b>Sentido Tallo-asa RT</b>	5'-TAT ATT A TCT CGC GAA TCG GAT G GAA GGA-3' CTT CCT  -3'
<b>MpmiR11742</b>	5'-CGG ACT CCA GTT GGC ATG TGC-3'
<b>Sentido Tallo-asa RT</b>	5'-TAT ATT A CGG ACT CCA GTT GGC ATG TGC-3' TAC ACG  -3'
<b>MpmiR166</b>	5'-TTC GGA CCA GGC TTC ATT CCC-3'
<b>Sentido Tallo-asa RT</b>	5'-TAT ATT G TTC GGA CCA GGC TTC ATT CCC-3' TAA GGG  -3'
<b>MpmiR319</b>	5'- CTT GGA CTG AAG GGA GCT CCC-3'
<b>Sentido Tallo-asa RT</b>	5'- CTT GGA CTG AAG GGA GCT CCC -3' CGA GGG  -3'
<b>MpmiR529</b>	5'-CCA GAA GAG AGA GAG CAC AGC-3'
<b>Sentido Tallo-asa RT</b>	5'-GTA TGT A CCA GAA GAG AGA GAG CAC AGC-3' 5'-GTG TCG  -3'
	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC -3' 44 nucleótidos de la secuencia tallo-asa de Chen <i>et al.</i> , (2005) en Kramer, (2011)
<b>Antisentido universal</b>	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3' Tomado de Kramer, (2011)

Nota: Símbolos:  identifica la región tallo-asa común. En azul se identifica el microRNA. En rosa se identifica la región complementaria antisentido del oligonucleótido tallo-asa para la RT.

## II Oligonucleótidos empleados para amplificar mRNAs

Nombre	Secuencia 5'-3'
MpEF1 $\alpha$ -L	TCA CTC TGG GTG TGA AGC AG
MpEF1 $\alpha$ -R	TCA CTCT GGG TGT GAA GCA G
MpAGO1_3UTR_F	GCC GAT CCC AAC TTC GCT TG
MpAGO1_3UTR_R	GGA TCC TTA GCA TCA ACT GCA AAG AGG
MpDCL1_3UTR_F	TTC ACC ATG GAC TCA TGG CTG AC
MpDCL1_3UTR_R	TTG ATC CGT GTC ATC CCT CAT CTT CA
MpRKD F	AGG AGA GGC CTG GAA TTG AG
MpRKD R	GGG AGC AAA CGG AAG GTT AT
MpMYB F	CTC TTG TTC CAG GCC GAA T
MpMYB R	AAA ATG CCG TGT AAG GGC TA

## Anexo D Análisis tipo BLAST del miR11732, 11742 y 11753

Query miR11732 Length=21		Score	E
Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
jgi:scaffold_183_320 Mpolymorpha 320 v3.1		39.2	0.095
>jgi:scaffold_183_320 Mpolymorpha 320 v3.1 Length=233547			
Score = 39.2 bits (42), Expect = 0.095 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Minus			
Query	1	GTGCTTGACTGCAAGATGGGC	21
Sbjct	95447	GTGCTTGACTGCAAGATGGGC	95427
Query miR11753 Length=22		Score	E
Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
jgi:scaffold_75_320 Mpolymorpha 320 v3.1		41.0	0.027
>jgi:scaffold_75_320 Mpolymorpha 320 v3.1 Length=1023827			
Score = 41.0 bits (44), Expect = 0.027 Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%) Strand=Plus/Plus			
Query	1	TCTCGGAATCGGATGGAAGGA	22
Sbjct	874081	TCTCGGAATCGGATGGAAGGA	874102
Query= miR11742 Length=21		Score	E
Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
jgi:scaffold_7_320 Mpolymorpha 320 v3.1		39.2	0.095
>jgi:scaffold_7_320 Mpolymorpha 320 v3.1 Length=2921375			
Score = 39.2 bits (42), Expect = 0.095 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%) Strand=Plus/Minus			
Query	1	CGGACTCCAGTTGGCATGTGC	21
Sbjct	1930171	CGGACTCCAGTTGGCATGTGC	1930151

## Anexo E Lecturas normalizadas de los miRNAs encontrados

	Control	N&C	Eq.M	Control	N&C	Eq.M
MpmiR1166a	6638	3684	3384	1233		
MpmiR319a	105	136	51	57		
MpmiR11666.1	292	206	147	94		
MpmiR11669.2	323	237	152	272		
MpmiR11670.5/1	44	32	23	12		
MpmiR11671.1	62	78	30	28		
MpmiR11672.1	246	223	136	202		
MpmiR11677	174	168	98	103		
MpmiR11679.1	12	22	7	9		
MpmiR11681.2	7	13	4	5		
MpmiR11684	5	4	2	0		
MpmiR11693a/c	218	137	119	113		
MpmiR11676.2	44	72	24	21		
MpmiR11685.2	17	5	9	1		
MpmiR11698.5	4	2	2	0		
MpmiR11703c	4	4	2	3		
MpmiR11715b	333	170	148	39		
MpmiR11727	46	14	21	25		
MpmiR11730	14	10	7	29		
MpmiR11731	274	455	125	123		
MpmiR11732	18	2	9	8		
MpmiR11734	59	92	29	91		
MpmiR11735	25	39	13	15		
MpmiR11737a	17	10	9	4		
MpmiR11737b	7	10	4	2		
MpmiR11739	17	29	8	19		
MpmiR11742a	9	37	4	27		
MpmiR11742b	2	9	1	16		
MpmiR11745	4	16	2	8		
MpmiR11747a	18	14	9	4		
MpmiR11747b	2	1	1	1		
MpmiR11749	7	10	4	1		
MpmiR11750	36	35	19	15		
MpmiR11752	20	17	11	3		
MpmiR11753	1	1	1	1		
MpmiR11754	11	14	7	3		
MpmiR11756	115	121	65	80		
MpmiR11757	13	8	6	6		
MpmiR11758	2	10	1	7		
MpmiR11767	1	0	0	0		
MpmiR11768a	222	110	97	31		
MpmiR11770	12	17	7	5		
MpmiR11771	1	5	0	1		
MpmiR11772	4	4	2	1		
mpo-MIR11775b	3	2	1	1		
MpmiR11775d	0	1	0	0		
MpmiR11779	11	7	6	0		
MpmiR11780	4	8	2	1		
MpmiR11781	8	17	4	3		
MpmiR11782	27	50	14	9		
MpmiR11785	8	12	5	5		
MpmiR11788	3	8	2	8		
MpmiR11794	4	6	2	1		
MpmiR11800	1	2	1	1		
MpmiR11805	84	66	43	32		
MpmiR11815	2	0	1	0		
MpmiR11823	3	4	2	0		
MpmiR11882	3	2	2	1		
MpmiR11884	1	0	0	0		
MpmiR11835	2	0	1	0		