

# Cambio climático y escasez hídrica: respuesta molecular frente a estresores ambientales en productores primarios acuáticos



Tesista: Pablo Javier Moreno Hurtado

**Profesor guía**

Dra. Fernanda Rodríguez

**Comisión evaluadora**

Dr. Claudio Sáez, Dra. Céline Lavergne y Dr. Erasmo Macaya

**Profesor a cargo del curso**

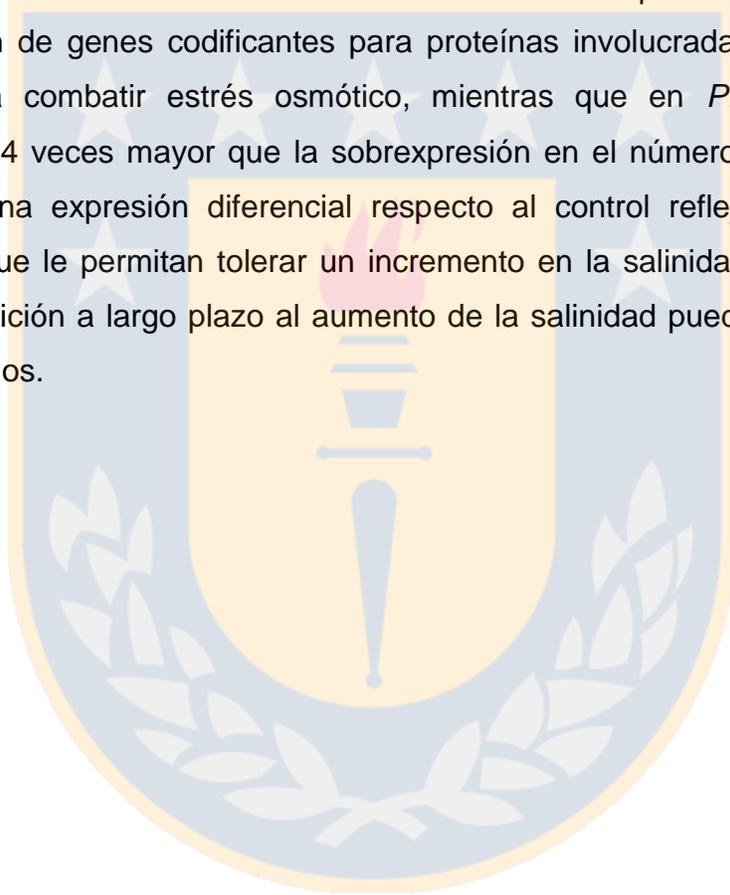
Dr. Víctor Hernández



## RESUMEN

El cambio global producto de la sobrepoblación y la mala gestión de los recursos naturales está acelerando el calentamiento global a una escala nunca antes registrada en nuestro planeta. Las zonas más afectadas por los aumentos de la temperatura son las polares, mientras que países del mediterráneo se enfrentan a la escasez hídrica que cada año se vuelve más evidente. Para combatir la falta de agua, se han invertido recursos en desarrollar métodos que permitan desalinizar el agua de mar para uso doméstico e industrial. Este proceso genera como desecho principal salmueras, que pueden afectar directamente a los ecosistemas costeros en especial a los organismos sésiles. Para entender los potenciales mecanismos de tolerancia de macrófitos frente a distintas consecuencias del Cambio Climático en esta tesis se analizó el transcriptoma del musgo *D. longifolius*, en condiciones control (2 °C) y de estrés por altas temperaturas (8 °C). Adicionalmente, para comprender cómo los vertidos de salmuera pueden afectar los ecosistemas costeros del mediterráneo, se analizaron los transcriptomas de dos especies de pastos marinos; *Posidonia oceanica* y *Cymodocea nodosa* de España, los cuales fueron sometidas a estrés por aumento de salinidad (37 PSU vs. 43 PSU). En *D. longifolius* se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con fotosíntesis y respiración. Se observó una sobreexpresión de genes relacionados con estrés, donde encontramos 3 codificantes para chaperonas; inhA, dnaj y Hsp212a, no se observaron genes involucrados en el metabolismo de estrés oxidativo. Se registró una inhibición de 123 genes relacionados a estrés, donde 7 codificaban para Hsps, 2 para Hsf, 5 codificaban para proteínas relacionadas con la respuesta a bajas temperaturas y 3 para proteínas involucradas en el metabolismo de estrés oxidativo. En los pastos marinos se observó una alta inhibición para genes codificantes de proteínas involucradas en fotosíntesis y respiración. En *C. nodosa* hubo inhibición de genes categorizados dentro de cadenas transportadoras de electrones (CTE), donde la gran mayoría, estaban relacionados con fotosíntesis y respiración; y además inhibición de genes relacionados con estrés como la chaperona Dnajc2. Por otro lado, hubo una sobreexpresión de genes relacionados a CTE, transporte y estrés. Dentro de los

genes relacionados con el estrés encontramos algunos codifican para proteínas con el motivo pentatricopeptido repetido, cuya función está relacionada con la respuesta a estrés abiótico. En *P. oceanica*, hubo una fuerte inhibición de genes en la categoría CTE, transporte y estrés. Dentro de los últimos encontramos la HSP70. Por otro lado, hubo una sobreexpresión de PCKR1 que cataliza el plegamiento de proteínas y WIN2 que es una proteína inducida por heridas. Se estableció que *C. nodosa* refleja mayores niveles de tolerancia al aumento de la salinidad, probablemente mediante la señalización por quinasas y la sobreexpresión de genes codificantes para proteínas involucradas en transporte que ayuden a combatir estrés osmótico, mientras que en *P. oceanica* una inhibición casi 4 veces mayor que la sobreexpresión en el número total de genes que poseen una expresión diferencial respecto al control refleja una falta de mecanismos que le permitan tolerar un incremento en la salinidad. Se hipotetiza que una exposición a largo plazo al aumento de la salinidad puede ser letal para estos organismos.



## SUMMARY

Global change due to overpopulation and mismanagement of natural resources is accelerating global warming on a scale never before recorded on our planet. The most affected areas by temperature increases are the polar ones, while Mediterranean countries face water scarcity that becomes more evident every year. To combat the lack of water, resources have been invested in developing methods to desalinate seawater for domestic and industrial use. This process generates brines as the main waste, which can directly affect coastal ecosystems, especially sessile organisms. To understand the potential tolerance mechanisms of macrophytes against different consequences of Climate Change, in this thesis the transcriptome of the moss *D. longifolius* was analyzed, under control conditions (2 °C) and high temperature stress (8 °C). Additionally, to understand how brine discharges can affect Mediterranean coastal ecosystems, the transcriptomes of two species of seagrasses were analyzed; *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from Spain, which were subjected to stress due to increased salinity (37 PSU vs. 43 PSU). In *D. longifolius*, an increase in the expression of genes related to photosynthesis and respiration was observed. Also, an overexpression of genes related to stress was observed, where we found 3 coding for chaperones; inhA, dnaj and Hsp212a, genes involved in oxidative stress metabolism were not observed. An inhibition of 123 genes related to stress was recorded, where 7 codified for Hsps, 2 for Hsf, 5 codified for proteins related to the response to low temperatures and 3 for proteins involved in the metabolism of oxidative stress. In seagrasses, a high inhibition was observed for genes encoding proteins involved in photosynthesis and respiration. In *C. nodosa* there was inhibition of genes categorized within electron transport chains (ETC), where the vast majority were related to photosynthesis and respiration; and also, inhibition of genes related to stress such as the chaperone Dnajc2. On the other hand, there was an overexpression of genes related to CTE, transport and stress. Within the genes related to stress, we find some that code for proteins with the repeated pentatricopeptide motif, whose function is related to the response to abiotic stress. In *P. oceanica*, there was a strong inhibition of genes in the CTE, transport and

stress category. Among the latter we find the HSP70. On the other hand, there was an overexpression of PCKR1, which catalyzes protein folding, and WIN2, which is a wound-induced protein. It was established that *C. nodosa* reflects higher levels of tolerance to increased salinity, probably through signaling by kinases and overexpression of genes coding for proteins involved in transport that help combat osmotic stress, while in *P. oceanica* an inhibition almost 4 times greater than the overexpression in the total number of genes that have a differential expression with respect to the control reflects a lack of mechanisms that allow it to tolerate an increase in salinity. It is hypothesized that long-term exposure to increased salinity may be lethal to these organisms.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>CAMBIO GLOBAL. ....</b>	<b>15</b>
<b>LOS PRODUCTORES PRIMARIOS, CENTINELAS DE LA SALUD DE LOS ECOSISTEMAS. ....</b>	<b>16</b>
<b>ESTRÉS ABIÓTICO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....</b>	<b>16</b>
<b>ESTRÉS POR TEMPERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>ESTRÉS POR SALINIDAD. ....</b>	<b>19</b>
<b>CASO DE ESTUDIO 1.....</b>	<b>20</b>
<b>CASO DE ESTUDIO 2.....</b>	<b>21</b>
<b>RNAseq .....</b>	<b>24</b>
RNAseq y estrés por temperatura. ....	24
RNAseq y estrés por aumento en la salinidad .....	25
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS. ....</b>	<b>27</b>
<b>GENERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>ESPECÍFICOS. ....</b>	<b>27</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>28</b>
<b>1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES. ....</b>	<b>28</b>
<b>2. IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LOS TRATAMIENTOS (DEGS) Y DISEÑO DE PARTIDORES. ....</b>	<b>29</b>
<b>3. EXTRACCIÓN DE RNA .....</b>	<b>30</b>
<b>4. PUREZA, INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA .....</b>	<b>30</b>
<b>5. SÍNTESIS DE cDNA.....</b>	<b>31</b>
<b>6. PCR CONVENCIONAL Y PCR CUANTITATIVO (qPCR) .....</b>	<b>31</b>
<b>7. TEST ESTADÍSTICO. ....</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>ANÁLISIS RNASEQ.....</b>	<b>33</b>
Drepanocladus longifolius.....	33
Cymodocea nodosa.....	40
Posidonia oceanica .....	45
<b>EXTRACCIONES Y CUANTIFICACION .....</b>	<b>50</b>
<b>PRUEBA DE PARTIDORES (PCR CONVENCIONAL) .....</b>	<b>52</b>
<b>qPCR de validación RNAseq <i>D. longifolius</i>.....</b>	<b>53</b>
TEST ESTADÍSTICO.....	54

**DISCUSIÓN** ..... 56

    Estrés por temperatura..... 56

    Estrés por salinidad ..... 58

**BIBLIOGRAFÍA** ..... 61



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. PARTIDORES PARA SOBREPRESIÓN EN *DREPANOCLADUS LONGIFOLIUS*. 29

TABLA 2. PARTIDORES PARA INHIBICIÓN EN *DREPANOCLADUS LONGIFOLIUS*. 30

FIGURA 1. GRÁFICO DE BARRAS DEL DEG DE *DREPANOCLADUS LONGIFOLIUS*. DE UN TOTAL DE 1560 GENES SECUENCIADOS, 560 (35,9%) PRESENTAN UNA SOBREPRESIÓN, 662 (42,4%) UNA INHIBICIÓN Y 338 (21,7%) PERMANECIERON SIN CAMBIO SEGÚN EL VALOR DEL LOG (2) FOLD CHANGE (BARRAS DE IZQUIERDA A DERECHA). 36

FIGURA 2. GRÁFICO DE TORTA PARA IDENTIFICAR LOS GRUPOS PRINCIPALES DE PROTEÍNAS QUE SE SOBREENPRESAN EN *DREPANOCLADUS LONGIFOLIUS*. LAS CATEGORÍAS FUERON ORDENADAS EN EL GRÁFICO SEGÚN EL NÚMERO TOTAL DE TRANSCRITOS SOBRE EL TOTAL DE GENES SOBREENPRESADOS, POR LO TANTO, LA CATEGORÍA OTROS, CORRESPONDE A LA DIFERENCIA ENTRE EL TOTAL DE GENES SOBREENPRESADOS Y LA SUMA DEL RESTO DE CATEGORÍAS. LOS GENES DENTRO DE LA CATEGORÍA OTROS CORRESPONDEN A UN 29,8%, ESTRÉS 13,6%, CTE 12,9%, QUINASAS 11,8%, TRANSPORTE 10,9%, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN 10,7%, METABOLISMO AZÚCARES 5% METABOLISMO LÍPIDOS 3,8%, DESCONOCIDOS 1,6%. 37

FIGURA 3. GRÁFICO DE TORTA PARA IDENTIFICAR LOS GRUPOS PRINCIPALES DE PROTEÍNAS QUE SE INHIBEN EN *DREPANOCLADUS LONGIFOLIUS*. LAS CATEGORÍAS FUERON ORDENADAS EN EL GRÁFICO SEGÚN EL NÚMERO TOTAL DE TRANSCRITOS SOBRE EL TOTAL DE GENES INHIBIDOS, POR LO TANTO, LA CATEGORÍA OTROS, CORRESPONDE A LA DIFERENCIA ENTRE EL TOTAL DE GENES INHIBIDOS Y LA SUMA DEL RESTO DE CATEGORÍAS. LOS GENES DENTRO DE LA CATEGORÍA OTROS CORRESPONDEN A UN 25,7%, ESTRÉS 18,6%, CTE 13,1%, TRANSPORTE 11,3%, METABOLISMO LÍPIDOS 8,2, METABOLISMO AZÚCARES 8,2%, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN 7,1%, QUINASAS 4,8%, DESCONOCIDOS 3%. 37

TABLA 3. TABLA RESUMEN DE LOS GENES MÁS SOBREENPRESADOS EN *D. LONGIFOLIUS*. LA PRIMERA COLUMNA CORRESPONDE AL ID DEL GEN EN LA PLATAFORMA TRINITY,

LA SEGUNDA COLUMNA CORRESPONDE A LOS VALORES DE LOG (2) FOLD CHANGE, LOS GENES ESTÁN ORDENADOS DE FORMA DESCENDENTE EN FUNCIÓN DE ESTE VALOR. LA TERCERA COLUMNA DESCRIBE EL NOMBRE Y/O FUNCIONALIDAD DEL GEN, Y LA CUARTA COLUMNA CORRESPONDE A LA CATEGORÍA EN DONDE SE ENCUENTRA EL GEN EN LA FIGURA 3. 37

**FIGURA 4. GRÁFICO DE DISPERSIÓN PARA EL LOG (2) DE LOS TPM DEL RNASEQ DE *DREPANOCLOUDUS LONGIFOLIUS*. ESTE GRÁFICO ES UNA VISUALIZACIÓN DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE CONDICIONES, CONTROL (EJE X) Y TRATAMIENTO (EJE Y). LAS CATEGORÍAS DE GENES FUERON DISEÑADAS A PARTIR DE LA FUNCIÓN Y/O TIPO DE PROTEÍNA QUE CODIFICABA EL GEN. EL NÚMERO DE CATEGORÍAS RESULTANTES FUE 7; QUINASAS, TRANSPORTE, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN, CADENAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRONES (CTE), METABOLISMO DE AZÚCARES, ESTRÉS Y METABOLISMO DE LÍPIDOS. MIENTRAS MÁS ALTO SÉ EL VALOR EN CADA EJE, MÁS ALTO ES EL CAMBIO EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES REPRESENTADOS EN ESA ÁREA Y VICEVERSA. POR EJEMPLO: EXISTE UN CAMBIO (AUMENTO EN ESTE CASO) EN CONDICIONES DE TRATAMIENTO VS. CONTROL EN LA EXPRESIÓN DEL GEN CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA TRN1; TORNADO 1 RELACIONADA CON EL TRANSPORTE DE AUXINAS, ENCERRADA EN UN CÍRCULO ROJO. EL GRUPO DE GENES EN EL CÍRCULO CELESTE SON LOS QUE POSEEN UN VALOR SIGNIFICATIVAMENTE MÁS ALTO EN SU EXPRESIÓN EN CONDICIONES DE TRATAMIENTO EN CONTRASTE AL CONTROL. EL GRUPO DE GENES EN EL CÍRCULO VERDE SON LOS QUE POSEEN UN VALOR MÁS SIGNIFICATIVO DE EXPRESIÓN EN EL CONTROL A COMPARACIÓN DEL TRATAMIENTO. 39**

**FIGURA 5. GRÁFICO DE BARRAS DEL DEG DE *CYMODOCEA NODOSA*. DE UN TOTAL DE 1123 GENES SECUENCIADOS, 137 (12,1%) PRESENTAN UNA SOBREEXPRESIÓN, 151 (13,4%) UNA INHIBICIÓN Y 835 (74,5%) PERMANECIERON SIN CAMBIO SEGÚN EL VALOR DEL LOG (2) FOLD CHANGE (BARRAS DE IZQUIERDA A DERECHA). 42**

**FIGURA 6. GRÁFICO DE TORTA PARA IDENTIFICAR LOS GRUPOS PRINCIPALES DE PROTEÍNAS QUE SE SOBREENPRESAN EN *CYMODOCEA NODOSA*. LAS CATEGORÍAS FUERON ORDENADAS EN EL GRÁFICO SEGÚN EL NÚMERO TOTAL DE TRANSCRITOS SOBRE EL TOTAL DE GENES SOBREENPRESADOS, POR LO TANTO, LA CATEGORÍA**

OTROS, CORRESPONDE A LA DIFERENCIA ENTRE EL TOTAL DE GENES SOBREPRESADOS Y LA SUMA DEL RESTO DE CATEGORÍAS. LOS GENES DENTRO DE LA CATEGORÍA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN CORRESPONDEN A UN 22,6%, QUINASAS 19,7%, ESTRÉS 17,5%, TRANSPORTE 16,8%, METABOLISMO LÍPIDOS 10,2%, METABOLISMO AZÚCARES 7,3%, CTE 5,1%. 42

FIGURA 7. GRÁFICO DE TORTA PARA IDENTIFICAR LOS GRUPOS PRINCIPALES DE PROTEÍNAS QUE SE INHIBEN EN *CYMODOCEA NODOSA*. LAS CATEGORÍAS FUERON ORDENADAS EN EL GRÁFICO SEGÚN EL NÚMERO TOTAL DE TRANSCRITOS SOBRE EL TOTAL DE GENES INHIBIDOS, POR LO TANTO, LA CATEGORÍA OTROS, CORRESPONDE A LA DIFERENCIA ENTRE TOTAL DE GENES INHIBIDOS Y LA SUMA DEL RESTO DE CATEGORÍAS. LOS GENES DENTRO DE LA CATEGORÍA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN REPRESENTAN UN 37,1%, CTE 17,9%, ESTRÉS 15,2%, TRANSPORTE 9,9%, OTROS 6%, METABOLISMO AZÚCARES 6%, METABOLISMO LÍPIDOS 3,3%, QUINASAS 2,6%. 43

TABLA 5. TABLA RESUMEN DE LOS GENES MÁS SOBREPRESADOS EN *C. NODOSA*. LA PRIMERA COLUMNA CORRESPONDE AL ID DEL GEN EN LA PLATAFORMA TRINITY, LA SEGUNDA COLUMNA CORRESPONDE A LOS VALORES DE LOG (2) FOLD CHANGE, LOS GENES ESTÁN ORDENADOS DE FORMA DESCENDENTE EN FUNCIÓN DE ESTE VALOR. LA TERCERA COLUMNA DESCRIBE EL NOMBRE Y/O FUNCIONALIDAD DEL GEN, Y LA CUARTA COLUMNA CORRESPONDE A LA CATEGORÍA EN DONDE SE ENCUENTRA EL GEN EN LA FIGURA 7. 43

TABLA 6. TABLA RESUMEN DE LOS GENES MÁS INHIBIDOS EN *C. NODOSA*. LA PRIMERA COLUMNA CORRESPONDE AL ID DEL GEN EN LA PLATAFORMA TRINITY, LA SEGUNDA COLUMNA CORRESPONDE A LOS VALORES DE LOG (2) FOLD CHANGE, LOS GENES ESTÁN ORDENADOS DE FORMA ASCENDENTE EN FUNCIÓN DE ESTE VALOR. LA TERCERA COLUMNA DESCRIBE EL NOMBRE Y/O FUNCIONALIDAD DEL GEN, Y LA CUARTA COLUMNA CORRESPONDE A LA CATEGORÍA EN DONDE SE ENCUENTRA EL GEN EN LA FIGURA 8. 44

FIGURA 8. GRÁFICO DE BARRAS DEL DEG DE *POSIDONIA OCEANICA*. DE UN TOTAL DE 1694 GENES SECUENCIADOS, 89 (5,2%) PRESENTAN UNA SOBREPRESIÓN, 330

(19,5%) UNA INHIBICIÓN Y 1275 (75,3%) PERMANECIERON SIN CAMBIO SEGÚN EL VALOR DEL LOG (2) FOLD CHANGE (BARRAS DE IZQUIERDA A DERECHA). 47

**FIGURA 9. GRÁFICO DE TORTA PARA IDENTIFICAR LOS GRUPOS PRINCIPALES DE PROTEÍNAS QUE SE SOBREENPRESARON EN *POSIDONIA OCEANICA*. LAS CATEGORÍAS FUERON ORDENADAS EN EL GRÁFICO SEGÚN EL NÚMERO TOTAL DE TRANSCRITOS SOBRE EL TOTAL DE GENES SOBREENPRESADOS, POR LO TANTO, LA CATEGORÍA OTROS, CORRESPONDE A LA DIFERENCIA ENTRE TOTAL DE GENES SOBREENPRESADOS Y LA SUMA DEL RESTO DE CATEGORÍAS. LA CATEGORÍA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN REPRESENTA UN 47,2%, CTE UN 13,5%, ESTRÉS 11,24%, OTROS UN 5,6%, TRANSPORTE 5,6%, METABOLISMO DE AZÚCARES 5,6%, METABOLISMO DE LÍPIDOS 4,5%, QUINASAS 4,5%, DESCONOCIDAS 2,3%. 47**

**FIGURA 10. GRÁFICO DE TORTA PARA IDENTIFICAR LOS GRUPOS PRINCIPALES DE PROTEÍNAS QUE SE INHIBEN EN *POSIDONIA OCEANICA*. LAS CATEGORÍAS FUERON ORDENADAS EN EL GRÁFICO SEGÚN EL NÚMERO TOTAL DE TRANSCRITOS SOBRE EL TOTAL DE GENES INHIBIDOS, POR LO TANTO, LA CATEGORÍA OTROS, CORRESPONDE A LA DIFERENCIA ENTRE TOTAL DE GENES INHIBIDOS Y LA SUMA DEL RESTO DE CATEGORÍAS. LA CATEGORÍA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN CORRESPONDE A UN 25,5%, ESTRÉS 15,8%, CTE 15,2%, TRANSPORTE 11,8%, OTROS 9,1%, METABOLISMO DE AZÚCARES 7,9%, METABOLISMO DE LÍPIDOS 7%, QUINASAS 6,1% Y DESCONOCIDAS 1,8%. 48**

**TABLA 7. TABLA RESUMEN DE LOS GENES MÁS SOBREENPRESADOS EN *P. OCEANICA*. LA PRIMERA COLUMNA CORRESPONDE AL ID DEL GEN EN LA PLATAFORMA TRINITY, LA SEGUNDA COLUMNA CORRESPONDE A LOS VALORES DE LOG (2) FOLD CHANGE, LOS GENES ESTÁN ORDENADOS DE FORMA DESCENDENTE EN FUNCIÓN DE ESTE VALOR. LA TERCERA COLUMNA DESCRIBE EL NOMBRE Y/O FUNCIONALIDAD DEL GEN, Y LA CUARTA COLUMNA CORRESPONDE A LA CATEGORÍA EN DONDE SE ENCUENTRA EL GEN EN LA FIGURA 10. 48**

**TABLA 8. TABLA RESUMEN DE LOS GENES MÁS INHIBIDOS EN *P. OCEANICA*. LA PRIMERA COLUMNA CORRESPONDE AL ID DEL GEN EN LA PLATAFORMA TRINITY, LA SEGUNDA COLUMNA CORRESPONDE A LOS VALORES DE LOG (2) FOLD CHANGE, LOS**

GENES ESTÁN ORDENADOS DE FORMA ASCENDENTE EN FUNCIÓN DE ESTE VALOR. LA TERCERA COLUMNA DESCRIBE EL NOMBRE Y/O FUNCIONALIDAD DEL GEN, Y LA CUARTA COLUMNA CORRESPONDE A LA CATEGORÍA EN DONDE SE ENCUENTRA EL GEN EN LA FIGURA 11. 49

**FIGURA 11. ELECTROFORESIS ARN (MÉTODO BLEACH-GEL). MUESTRAS DE *D.LONGIFOLIUS* DEL TRATAMIENTO A 2 °C EN LOS POCILLOS 2 Y 3. MUESTRAS DE *D.LONGIFOLIUS* DEL TRATAMIENTO A 8 °C EN LOS POCILLOS 4 Y 5. CORRIDAS POR 40 MINUTOS A 100 V. CADA POCILLO SE CARGO CON 2 µL DE RNA Y 2 µL DE BUFFER DE CARGA. 51**

**FIGURA 12. ELECTROFORESIS ARN (MÉTODO BLEACH-GEL). MUESTRAS DE *D.LONGIFOLIUS* DEL TRATAMIENTO A 8 °C. CORRIDAS POR 40 MINUTOS A 100 V. CADA POCILLO SE CARGO CON 2 µL DE RNA Y 2 µL DE BUFFER DE CARGA 51**

**TABLA 14. COMPARACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE RNA OBTENIDO POR ABSORBANCIA VS. FLUORESCENCIA. 52**

**FIGURA 12. PRUEBA DE PARTIDORES DE *D. LONGIFOLIUS*. GEL DE AGAROSA 1,5%, 45 MINUTOS A 100 VOLTS. (PCR 35 CICLOS). 53**

**TABLA 15. TABLA RESUMEN DE LOS PROMEDIOS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE LOS FOLD CHANGE OBTENIDOS EN qPCR DE CADA GEN DE *DREPANOCLADUS LONGIFOLIUS*. 54**

**FIGURA 13. GRÁFICOS DE EXPRESIÓN RELATIVA PARA VALIDACIÓN DEL RNASEQ. CONTROL, TRATAMIENTO Y RNASEQ PARA LOS GENES CA (A) CABP (B), CAT(C) Y GST(D) ME (E) Y TIF (F). LA BARRA ROJA CON ASTERISCO INDICA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE CONTROL Y TRATAMIENTO SEGÚN TEST DE YUEN (VALOR P < 0,05). 55**



## INTRODUCCIÓN.

### CAMBIO GLOBAL.

El calentamiento global está enmarcado dentro de lo que hoy se denomina cambio global, y según el último reporte del IPCC (Panel intergubernamental en cambio climático) en el 2018 actualmente la temperatura de la tierra ha aumentado entre 0,8 °C y 1,2 °C en comparación a los niveles preindustriales, siendo las últimas tres décadas las más calurosas. Según el IPCC, un aumento de 1,5 °C respecto a los niveles preindustriales, desencadenará una serie de eventos catastróficos a nivel ecosistémico y social. Se predice con un alto nivel de confianza que dicho aumento de temperatura sucederá entre el 2030 y el 2052 si la temperatura sigue aumentando al mismo ritmo que lo ha hecho en las últimas décadas (IPCC, 2018). Por otra parte, el crecimiento de la población a nivel global junto con el crecimiento económico han sido los principales motores del cambio global. Se estima que cerca del 40% de la población mundial sufre de escasez hídrica, para el 2025 se proyecta un aumento al 60% en la demanda de agua solo para su uso en la agricultura, mientras que para el 2050 la demanda para el uso global, incluyendo la agricultura es de entre un 20% y 30% (Jones *et al.*, 2018; UNEP, 2017; Fernández-Torquemada *et al.*, 2009). Debido a la creciente demanda de agua, una creciente solución alternativa es la utilización de agua de mar para la producción de agua potable o agua de riego. Desde el 2003 se ha registrado a nivel global un crecimiento exponencial de plantas desalinizadoras. Por ejemplo, en los países del mediterráneo, más del 80% del agua dulce es de origen marino y se produce en plantas desalinizadoras (UNEP, 2017). La mayor concentración de plantas desalinizadoras está en el sur del mediterráneo, donde más se sufre la escasez hídrica (UNEP, 2017).

La desalinización de agua es un proceso que se puede llevar a cabo mediante variadas técnicas, por lo tanto, su impacto va a depender de la técnica, pero dentro del común denominador de estos impactos está la descarga de salmueras al mar, las cuales se definen como: la descarga hipersalina y tibia de los procesos de desalinización (UNEP, 2017; Fernandez-Torquemada *et al.*, 2009).

## **LOS PRODUCTORES PRIMARIOS, CENTINELAS DE LA SALUD DE LOS ECOSISTEMAS.**

Los organismos fotosintéticos representan la base de las tramas tróficas en los ecosistemas en los que están presentes, son estos organismos los que actúan como productores primarios, es decir usan la energía solar para transformarla en materia y energía que fluye a través del resto de los compartimentos de las redes tróficas (Guillen *et al.*, 2013; Sáez *et al.*, 2015). En Antártica, por ejemplo, los musgos son colonizadores primarios y los principales formadores de biomasa y suelo (Prather *et al.*, 2019). En el mar mediterráneo los pastos marinos son considerados ingenieros del ecosistema, ya que son capaces de modular directamente o indirectamente la disponibilidad de recursos, y además son capaces de modificar el paisaje a través de su estructura física, viva y muerta (Boudouresque *et al.*, 2009).

Debido a su abundancia y naturaleza son de fácil monitoreo y muestreo. Existe diversa información en la bibliografía acerca de la creciente perturbación en los ambientes naturales debido al cambio global. Hay estudios que sugieren que cambios significativos en el ambiente afectan directamente la composición de las comunidades, pues existen organismos tolerantes y organismos sensibles a dichas perturbaciones. Este cambio en la composición debería atribuirse principalmente a los productores primarios, ya que, son los encargados de ingresar la energía a los ecosistemas en los que están insertos y se espera que su presencia o ausencia se vea reflejado en la composición de las comunidades que constituyen estos ecosistemas.

### **ESTRÉS ABIÓTICO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Las especies reactivas de oxígeno, o ROS, son moléculas altamente oxidantes que, en condiciones fisiológicas normales, se producen de forma controlada como subproducto de algunos procesos metabólicos. Los ROS permanecen en equilibrio con enzimas antioxidantes. Las moléculas antioxidantes degradan las especies reactivas de oxígeno en peróxido de hidrógeno, agua y oxígeno. Algunos ejemplos de antioxidantes son como lo son las siguientes enzimas; catalasa (CAT), glutatión

reductasa (GSH), ascorbato peroxidasa (APX) y la superóxido dismutasa (SOD) principalmente (Foyer & Noctor, 2005; Singh & Tuteja, 2010). Las moléculas ROS son producidas en organelos con cadenas transportadoras de electrones o con actividades metabólicas oxidantes altas tales como las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas (Del rio *et al.*, 2006; Navrot *et al.*, 2007; Singh & Tuteja, 2010). Existen distintas fuentes de estrés abiótico en las plantas que pueden inducir la sobreproducción de ROS, como lo son el aumento o disminución de la temperatura, aumento o disminución de la salinidad, sequía, exposición a radiación UV, etc. (Mittler R, 2002; Apel & Hirt, 2005; Mahajan & Tuteja, 2005; Khan & Singh, 2008; Tuteja & Hirt, 2010; Singh & Tuteja, 2010).

La acumulación de ROS genera un desequilibrio respecto a las moléculas antioxidantes, esto conduce a un estado de estrés oxidativo donde los procesos metabólicos basales de las plantas se ven interrumpidos y aumenta la actividad metabólica para producir moléculas antioxidantes (Mittler R, 2002; Mittler *et al.*, 2004; Singh & Tuteja, 2010). Si es que el organismo se somete a condiciones de estrés que no le permiten degradar rápidamente las especies reactivas de oxígeno en agua, entonces se puede producir daño en el material genético (ADN) y finalmente muerte celular (Singh & Tuteja, 2010; Gill *et al.*, 2011).

### **ESTRÉS POR TEMPERATURA.**

Las ecuaciones de balance energético nos permiten analizar cómo las plantas experimentan la temperatura, se dice que básicamente en equilibrio la ganancia y la pérdida de calor son constantes. Tres rutas importantes de pérdida o ganancia de calor son: 1) transferencia de calor sensible, 2) transferencia de calor radiante y 3) transferencia de calor latente. La temperatura de las plantas es principalmente dependiente del ambiente, pero en cierta medida también depende del flujo de energía radiante (Sharkey & Schrader, 2009). A raíz del análisis de las ecuaciones de balance energético, la literatura describe 3 posibles condiciones de estrés por temperatura; 1) Cuando la temperatura del aire es alta, las plantas tenderán a acercarse a la zona de alta temperatura por transferencia de calor sensible, 2) en la superficie del suelo, donde los rayos del sol pueden causar una diferencia de

temperatura sustancial respecto a la del aire, 3) en las hojas, donde la radiación solar y la baja capacidad calentamiento de las hojas se combinan para aumentar rápidamente la temperatura de la hoja hasta 15 °C más que la temperatura ambiente (Sharkey & Schrader, 2009). Las proteínas se denaturan fácilmente con las altas temperaturas, pero la mayoría de los organismos tienen un set de proteínas que se sintetizan en respuesta a las altas temperaturas y que parecen ser diseñadas para prevenir o revertir la denaturación por calor, a estas proteínas se les conoce como Hsp (Heat shock proteins). Muchas de estas Hsp también se sintetizan bajo estrés osmótico y oxidativo (Sharkey & Schrader, 2009). Dentro de las familias o clases más importantes de Hsp encontramos Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y smhps, todas ellas corresponden a una familia de moléculas altamente conservadas llamadas chaperonas. Particularmente las smhps (small heat shock proteins) presentan una alta representatividad dentro de las plantas, y se hipotetiza que han sido las responsables de permitir a las plantas su gran diversificación y su adaptación a las altas fluctuaciones de temperatura en el medio terrestre (Sharkey & Schrader, 2009; Saidi *et al.*, 2009). En musgos, que son considerados plantas inferiores por no poseer sistema vascular, la respuesta a shock térmico (abreviada HSR, del inglés Heat shock response) es modulada por una vía de señalización dependiente del Ca<sup>2+</sup> que involucra canales específicos que permiten la entrada de este ion al citoplasma generando una acumulación de Hsp70 y estableciendo termo tolerancia (Saidi *et al.*, 2009). Incluso se sugiere la existencia de dos canales distintos de Ca<sup>2+</sup> sensibles a estrés osmótico que activan vías metabólicas relacionadas a combatir el estrés osmótico (Saidi *et al.*, 2009). También, se ha reportado que existe un incremento en ROS cuando se someten a estrés por temperatura algunos modelos de plantas superiores como la espinaca, debido a la inhibición de la síntesis de proteínas que permiten llevar a cabo la fotosíntesis, esta acumulación sucede principalmente en la fase oscura (Mathur *et al.*, 2014).

## ESTRÉS POR SALINIDAD.

En pastos marinos, los mecanismos más importantes para mantener el equilibrio osmótico y contrarrestar el estrés por salinidad en pastos marinos está relacionado a: la exclusión celular iónica, la compartimentalización de iones en organelos, el transporte y producción de osmolitos y la defensa antioxidante (Touchette, 2007). Un aumento en las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el medio extracelular puede inducir a un incremento en los niveles intracelulares de estos mismos iones, lo que al superar ciertos límites de concentración puede volverse tóxico y afectar procesos fisiológicos y metabólicos (Guillen *et al.*, 2013; Manea *et al.*, 2020). El estrés por salinidad en pastos marinos puede ser impulsado por distintos procesos, dentro de los cuales los más relevantes pueden ser: disminución del potencial de membrana mediado por el ingreso de  $\text{Na}^+$  derivando en la acumulación de  $\text{Cl}^-$ , inhibición enzimática por el exceso de  $\text{Na}^+$ , desequilibrio osmótico debido a la acumulación de iones en el medio intracelular, exceso de energía inducido por el  $\text{Na}^+$  se transfiere al oxígeno e incrementa el número de ROS (Touchette, 2007; Sandoval-Gil *et al.*, 2012). El proceso más desafiante en mantener la homeostasis iónica es el control de los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de mecanismos de transporte dependientes y no dependientes de energía. Muchos canales relacionados con el transporte de  $\text{K}^+$  a través de la membrana, tales como los canales permeables a cationes no sensibles a voltaje (VIC) y los canales de regulación de  $\text{K}^+$  interno (KIR) y externo (KOR) que en menor medida también son permeables a  $\text{Na}^+$ . En adición a los canales existen muchos otros transportes hacia dentro y fuera de la membrana que ayudan a regular el equilibrio iónico y que trasladan iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^+$ , incluso favorecen el flujo hacia y desde el tonoplasto de la vacuola; en este ámbito se han encontrado un sinnúmero de uniporters, antiporters y symporters relacionados con  $\text{H}^+$ -ATPasas, bombas de protones y transportadores dependientes de fosfatasa (Touchette, 2007; Carpaneto *et al.*, 2004; Sandoval *et al.*, 2012; Garrote-Moreno *et al.*, 2015). En *Zostera marina* (Linneo, 1753), por ejemplo, un pasto marino tolerante a la sal, se encontraron antiporters de la familia NHX (genes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters vacuolares), los cuales participan en la extrusión de los iones de  $\text{Na}^+$  desde el

citósol a la vacuola, gracias al incremento de H<sup>+</sup> mediado por H<sup>+</sup>-ATPasas y H<sup>+</sup>-PPasas. También se encontraron proteínas SOS1 (gen transportador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática) y SOS3 (gen de proteína de unión Ca<sup>2+</sup>) involucradas en el intercambio de iones Na<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> (Kong *et al.*, 2014).

## CASO DE ESTUDIO 1.

Antártica, de sus 14 millones de km<sup>2</sup> cerca del 0,34% corresponden a superficies de hielos y nieves estacionales. La vegetación de este continente es dominada por la flora criptógama (líquenes y musgos *s.l.*) y solo posee 2 angiospermas. Dentro de las criptógamas, los musgos dominan la parte oeste de la Península Antártica cubriendo la mayor parte del suelo. La importancia de estos organismos recae en la producción de biomasa terrestre. Junto con su microfauna asociada cumplen importantes funciones en los ecosistemas, desde el reciclaje de nutrientes hasta la formación de complejas redes de tróficas. También se les considera valiosos impulsores de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas. En el ecosistema polar, la acumulación de biomasa proveniente de los musgos provee una capa de aislamiento térmico, actúa como reservorio de agua líquida y presenta capacidad de intercambiar cationes (Prather *et al.*, 2019; Soudzilovskaia *et al.*, 2013). Por lo tanto, en términos de calentamiento global, la cubierta de musgos de la Antártica se presenta como un crucial sumidero de carbono y tiene una fuerte influencia en las temperaturas del suelo, los ciclos hídricos y de nutrientes (Prather *et al.*, 2019; Longton, 1997; Soudzilovskaia *et al.*, 2013). *Drepanocladus longifolius* (Brotherus ex Paris, 1909) es un musgo que se considera bipolar, es decir, que crece en ambas regiones polares del planeta, según varios autores (Saluga *et al.*, 2018). Crece por lo general en lugares saturados de agua, pero en la Antártica está mejor adaptado para crecer bajo el agua de algunos lagos, llegando a ser la vegetación dominante de estos ambientes. Un análisis filogenético para comparar poblaciones boreales y australes llegó a la conclusión de que *D. longifolius* solo se encuentra en el hemisferio sur, y que las poblaciones australes de este musgo, particularmente las de antártica, presentan un polimorfismo genético solo en una

región codificante de ADN (Saluga *et al.*, 2018). Se trataba de una sustitución sin sentido en un nucleótido de ADN codificante para la proteína ribosomal S4 del plastidio, la cual está relacionada con el proceso de ensamble de la subunidad 30S. Se hipotetiza que debido a esta sustitución, el musgo ha sido capaz de adaptarse a la vida subacuática en los lagos de la antártica y las condiciones de luz que conlleva este ambiente. Desde un punto de vista biogeográfico se sugiere que estas poblaciones arribaron en un proceso de recolonización postglacial y que esta mutación puede ser una respuesta a presión selectiva (Saluga *et al.*, 2018). Si bien la respuesta molecular al aumento de temperatura no ha sido explorado en dicho musgo acuático, un estudio en macrófitos acuáticos de la Antártica evidencia un incremento en moléculas antioxidantes y codificantes para Hsp al incrementar la temperatura del agua de 2 °C a 8 °C, donde la expresión relativa de SOD, APX, GR, Hsp40 y Hsp70-3 aumenta significativamente al tercer día de tratamiento (Celis-Pla *et al.*, 2020). Respecto a los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en general, existe un aumento relacionado de manera directamente proporcional al aumento de temperatura para la dos tercios de las especies de algas estudiadas en el trabajo de Celis-Pla *et al.*, 2020. En general, al quinto día de tratamiento los niveles de peróxido de hidrógeno y moléculas antioxidantes disminuyen a niveles basales en todas las especies, lo que sugiere un mecanismo adaptativo de estos productores primarios a los incrementos de temperatura. (Celis-Pla *et al.*, 2020). Otros estudios de estrés por aumento de temperatura en el musgo *Physcomitrella patens* (Hedw., 1801) han encontrado que los primeros señalizadores en gatillar una HSR a nivel celular están involucrados en la composición y fluidez de la membrana junto a canales de calcio específicos (Saidi *et al.*, 2009; Saidi *et al.*, 2010, Finka *et al.*, 2012). Más aun, se ha comprobado que la HSR necesita un periodo de recuperación para reiniciarse y volver a ser completamente funcional (Saidi *et al.*, 2009; Ruibal *et al.*, 2013; Elzanati *et al.*, 2020).

## **CASO DE ESTUDIO 2.**

El Mar Mediterráneo posee una gran variedad de ecosistemas y un alto nivel de endemismo, pero su alta exposición a la acción antrópica han puesto bajo amenaza su biodiversidad. Es por esto que se han hecho distintos esfuerzos de

generar evidencia científica que ayude a conservar estos ecosistemas que dadas las características mencionadas al principio se reconocen como un hotspot de biodiversidad. Tanto países europeos y no europeos forman parte de las costas de este mar (Bevilacqua *et al.*, 2020; Pisano *et al.*, 2020; Manea *et al.*, 2020; Sandoval-Gil *et al.*, 2012). Debido a la instalación de plantas desalinizadoras de agua, el ecosistema está en potencial riesgo por un aumento en la salinidad por la descarga de salmueras (Sandoval-Gil *et al.*, 2012; Boudouresque *et al.*, 2009). *Posidonia oceanica* (Delile, 1813), es un pasto marino endémico de las costas del mar Mediterráneo y junto con *Cymodocea nodosa* (Ascherson, 1888) forman extensos prados, que representan zonas de alta productividad primaria, participa en la estabilización hidrodinámica de la costa y son una pieza clave de los ecosistemas a los que se asocian (Carpaneto *et al.*, 2004; Boudouresque *et al.*, 2009). La reproducción asexual de estos pastos a través de esquejes o clones es dominante por sobre la reproducción sexual, por lo tanto, las poblaciones de estos individuos tienen un bajo nivel de variabilidad genética, lo que los hace poco tolerantes como poblaciones a cambios drásticos en su ambiente (Carpaneto *et al.*, 2004; Sandoval-Gil *et al.*, 2012). Uno de los factores ambientales con mayor peso dentro de la supervivencia de los pastos marinos es la salinidad (Rubio *et al.*, 2018). La unidad de medida de la concentración de sal es PSU, de sus siglas en inglés "Practical Salinity Units". En promedio el mar posee una salinidad de 35 PSU y los pastos marinos suelen mantener un desempeño biológico óptimo entre los 30 y 40 PSU (Fernández-Torquemada & Sánchez-Lizaso, 2005; Carpaneto *et al.*, 2004; Sandoval-Gil *et al.*, 2012). *P. oceanica* posee una baja tolerancia a los cambios en la salinidad, mientras que *C. nodosa* es tolerante a ambientes con baja salinidad pero no a ambientes con alta salinidad (Sandoval-Gil *et al.*, 2012; Boudouresque *et al.*, 2009). Los estudios de laboratorio llevados a cabo en *P. oceanica* han demostrado que la vitalidad del organismo se debilita conforme aumenta la salinidad, esto se traduce en tejido necrótico, inhibición en el crecimiento foliar y de tallos, senescencia prematura y permanente de las hojas y finalmente en un incremento de la mortalidad, con valores estadísticamente significativos desde los 39,1 PSU (Sánchez-Lizaso *et al.*, 2008). Una propiedad básica de los pastos marinos es la osmorregulación, para lo cual han desarrollado

distintas estrategias fisiológicas que les permiten mantener el flujo de agua entrante y el equilibrio iónico. En *P. oceanica*, existen evidencias de distintas fuentes que sugieren un cambio negativo en la presión osmótica, el turgor de las hojas y el tallo. Además, la acumulación de carbohidratos y sales actúan como osmolitos para contrarrestar los efectos del estrés osmótico. En el caso de *C. nodosa* se reporta que solo el turgor disminuye significativamente en los tratamientos hipersalinos prolongados en el tiempo y una acumulación de osmolitos no es necesaria bajo este mecanismo para regular el equilibrio osmótico. (Touchette, 2007; Sandoval-Gil *et al.*, 2012; Marín-Guirao *et al.*, 2013; Garrote-Moreno *et al.*, 2015). En contraste a estos hallazgos, en otra investigación se encontró que en las fases tempranas de exposición a altas salinidades existe una acumulación de osmolitos en el tejido de las hojas de *C. nodosa*, lo que provocan una pérdida de potencial osmótico significativa que lleva a una pérdida de potencial hídrico, pero manteniéndose una presión osmótica interna inalterada. Sin embargo, después de 1 mes de exposición a hipersalinidad se observó un incremento en el turgor debido a la pérdida constante del potencial osmótico producto de la elevada acumulación de osmolitos en el tejido de las hojas (Piro *et al.*, 2015). Finalmente, dicho aumento de salinidad, de forma prolongada en el tiempo, tiene consecuencias al nivel del metabolismo fotosintético, entre otros. Para *C. nodosa*, se ha reportado una tasa de eficiencia fotosintética constante a corto y largo plazo, sin embargo, genes codificantes para RuBisCo, subunidad PsbS del PSII y la enzima malato deshidrogenasa involucrados en dicho metabolismo han presentado una inhibición, y a su vez se registró una sobreexpresión de genes codificantes para la subunidad alfa del citocromo b559, la subunidad alfa de la ATP sintasa cloroplástica la sub unidad III del centro de reacción del PSI (Piro *et al.*, 2015). En el caso de *P. oceanica* se ha reportado un aumento del 21% en su actividad de respiración y una inhibición del 29% de su capacidad fotosintética después de 3 meses de exposición a hipersalinidad de 43 PSU versus un control de 37 PSU (Marín-Guirao *et al.*, 2013).

## RNAseq

El RNAseq es una técnica de secuenciación aleatoria de la molécula de ARN (Hardlickova *et al.*, 2017). Es el método de preferencia hoy en día para entender la expresión de genes en los organismos bajo distintas condiciones, es capaz de revelar la identidad de las secuencias de RNA, lo cual es crucial para la identificación de genes desconocidos o isoformas de genes ya conocidos (Hardlickova *et al.*, 2017). Existen distintos métodos de interpretación, pero el más utilizado para estudiar la expresión de genes es el DGE seq o Tag-seq, el cual puede ser empleado a pesar de no poseer el genoma o transcriptoma completo del organismo (Hardlickova *et al.*, 2017).

### *RNAseq y estrés por temperatura.*

Elzanati *et al.*, 2020 midieron la expresión de genes relacionados con HSP en *Physcomitrella patens* a 37 °C. A la hora del tratamiento hubo una sobreexpresión de 10 genes, mientras que a las 6 y 12 horas hubo una sobreexpresión de 44 genes, lo cual es consistente con la hipótesis de recuperación de HSR puesta a prueba anteriormente por Saidi *et al.*, 2009 y Ruibal *et al.*, 2013. En la misma investigación se encontraron 4 genes homólogos a Hsf2B de *Arabidopsis thaliana* (Linneo., 1753) de los cuales 2 estaban sobreexpresados a 1 hora con 37 °C, sugiriendo una regulación negativa de HSR, tal como se plantea en el trabajo de Ikeda *et al.*, 2011. En cuanto a la inhibición, a 37 °C se reportó un aumento de genes involucrados en el plegamiento de proteínas conforme incrementaba la duración del experimento, respaldando la hipótesis general de que a altas temperaturas aumenta el número de proteínas mal plegadas.

Zhang *et al.*, 2020, estudiaron las plantas de *Solanum melano-gen* L. bajo estrés por temperatura en condiciones de laboratorio (control 28 °C, T1 = 38 °C y T2 = 43 °C). Para el T1 vs. control, los resultados arrojaron que la mayoría de genes que codificaban para las moléculas antioxidantes peroxidasa (POD), ascorbato, peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR) y glutatión peroxidasa (GPX) exhibían una baja expresión. Sin embargo

se registró una sobreexpresión de 3 genes que codificaban para las moléculas POD, APX y GPX. Adicionalmente, 5 genes codificantes para la molécula antioxidante glutatión s-reductasa (GST) se sobreexpresaban y, 4 se inhibían. Para el T2 versus el Control, 6 genes codificantes para GST se sobreexpresaban y 2 se inhibían.

En plantas de trigo expuestas a estrés por temperatura se registró una sobreexpresión de genes asociados a fotosíntesis como COX3, citocromo P450 Y RCA, que actúa como una chaperona catalizadora de la activación de RuBisCo, genes asociados directamente al estrés por temperatura como HSP90, HSP101, HSP17.8 y Hsfa-6a. Dentro de los genes mas inhibidos encontraron un transportador de sacarosa, una gen codificante para una proteína específica de polen, un gen de Histona H3. En general observaron una alta inhibición para genes involucrados en metabolismo de lípidos, sacarosa, nitrógeno y aminoácidos (Kumar *et al.*, 2015).

#### *RNAseq y estrés por aumento en la salinidad*

En *C. nodosa* se encontró una sobreexpresión de 99 genes y una inhibición de 179 genes en un experimento donde el grupo control estaba a 35 PSU y el tratamiento a 50 PSU. Dentro de los genes cuya expresión diferencial presento mayores cambios estaban en orden descendente, los involucrados en procesos biológicos de respuesta a estímulo, respuesta a estrés, respuesta a estímulo químico, respuesta a sustancias orgánicas, respuesta a estímulo abiótico. Uno de los genes más sobreexpresados codificaba para serina/treonina quinasa (RLK1), (Malandraki *et al.*, 2017) que está relacionada con procesos de crecimiento y desarrollo (Hématy & Höfte, 2008; Nibau & Cheung, 2011). Además, en plantas transgénicas de *A. thaliana* se ha descubierto que al sobreexpresar esta proteína RLK1 aumenta la tolerancia a la salinidad. Dentro de los genes codificantes para proteínas estructurales hubo una inhibición de los que codificaban para enzimas del PSI y PSII.

Otro ejemplo de análisis transcriptómico en estrés por salinidad fue un experimento en *Aleuropus littoralis* (Gouan, 1848), una fanerógama terrestre que

se expuso a dos tratamientos con salinidad (NaCl), uno de 200 mM y otro de 400 mM. A los 200 mM hubo una sobreexpresión de 169 genes y una inhibición de 316 genes. A los 400 mM hubo una sobreexpresión de 1035 genes y una inhibición de 316 genes. Para ambos tratamientos hubo una sobreexpresión de 89 genes en común, 80 fueron específicos para 200 mM y 944 fueron específicos para los 400 mM. En inhibición, 49 genes fueron comunes para ambos tratamientos, 265 específicos para 200 mM y 381 específicos para 400 mM. Dentro de los genes sobreexpresados más representativos a 400mM se encontraron PP2, ABF y SNRK2 que están involucrados en vías de señalización hormonal ABA, también se encontró una sobreexpresión de GH3 y SAUR involucrados en señalización hormonal de auxinas (Younesi-Melerdi *et al.*, 2020).

En la especie de pasto marino *Z. marina* se encontraron factores de transcripción de elementos de respuesta a deshidratación (DREB TFs) con una sobreexpresión significativa en tratamientos con concentraciones de NaCl a 0,4 M, hubo una sobreexpresión del gen vacuolar CAX encargado del intercambio protónico, y del gen codificante para H<sup>+</sup>-ATPasa. Genes relacionados con la fotosíntesis como el centro de reacción del PSII, complejo ubiquinol-citocromo c reductasa y proteína de unión entre clorofila a/b y Lhc I/II se encontraron inhibidos en los tratamientos (Lv *et al.*, 2018).

En esta investigación se analizaron los transcriptomas de los pastos marinos *P. oceanica* y *C. nodosa* bajo estrés por hipersalinidad (37 vs 43 psu); y el transcriptoma del musgo *D. longifolius* bajo estrés por aumento de temperatura (2 °C vs 8 °C). Se identificaron los principales grupos de genes codificantes para proteínas involucradas en la tolerancia y respuesta de los organismos al estrés abiótico y finalmente se validó el transcriptoma de *D. longifolius*, a través de la técnica de qPCR.

## HIPÓTESIS

“En *D. longifolius* se observará una sobreexpresión de genes codificantes para HSPs y proteínas transportadoras.”

“En los pastos marinos se observará una inhibición en los genes codificantes para proteínas relacionadas con la fotosíntesis y respiración celular.”

### OBJETIVOS.

#### GENERAL.

Analizar el transcriptoma de 3 especies de macrófitos acuáticos expuestos a estrés abiótico, derivados del cambio global y validar el transcriptoma de una especie mediante la técnica de qPCR.

#### ESPECÍFICOS.

1. Analizar el transcriptoma de *D. longifolius* bajo estrés por temperatura.
2. Analizar los transcriptomas de *C. nodosa* y *P. oceanica* bajo condiciones de estrés por salinidad.
3. Validar RNAseq de *D. longifolius* a través de la técnica de qPCR.

## METODOLOGÍA.

### 1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.

#### 5.1. Efecto de la temperatura: *Drepanocladus longifolius*

Durante el verano del 2019, en la expedición científica Antártica número 55 (ECA-55), el grupo LACER de la UPLA tomó muestras del musgo *D. longifolius* en el fondo del lago Kitiash en la isla Rey Jorge, Península Antártica (62°11.595'S; 58°57.988'W). El tejido de musgo se lavó primero con agua de lago, luego se aclimató en agua de lago filtrada durante 48 horas en oscuridad a 2 °C. Posteriormente, el tejido de musgo se dividió y traspasó a recipientes de plástico con agua de lago filtrada bajo aireación constante y se expuso a 2 °C (control) y 8 °C durante 3 días, en triplicado biológico para ambos casos. El fotoperíodo fue 20:4 h (día / noche), en condiciones de luz diurna de radiación fotosintética activa (PAR) de 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Después de 3 días, las muestras se lavaron con buffer TRIS-HCl 100 mM pH 7.5, se congelaron con nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

#### 5.2. Efecto de la salinidad: *P. oceanica* y *C. nodosa*

*P. oceanica* y *C. nodosa* fueron recolectadas frente al Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad de Alicante, en Santa Pola, España (38°12'30.6"N 0°30'25.7"W) en aguas de una profundidad promedio de 2,5 m. Fueron aclimatados en agua de mar filtrada (1  $\mu\text{m}$ ) por 48 horas con un fotoperíodo de 12:12 h (día/noche), condiciones de luz PAR de 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y a 25° C. Los experimentos para ambos pastos marinos, fueron en triplicados que consistieron en un control de 37 PSU y un tratamiento de 43 PSU por 7 días, bajo las mismas condiciones de aclimatación. Las salinidades se obtuvieron adicionando sales de mar artificiales (Instant Ocean) al agua de mar filtrada hasta lograr la salinidad deseada, la cual fue medida utilizando una sonda multiparamétrica marca HANNA instruments modelo HI 98194.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LOS TRATAMIENTOS (DEGS) Y DISEÑO DE PARTIDORES.

En un trabajo previo se extrajo RNA de las muestras y se enviaron a secuenciar a la empresa BGI en China. Según los resultados del RNAseq obtenidos previamente en HUB AMBIENTAL UPLA. En el musgo se escogieron 9 genes que se sobreexpresan y 9 que se inhiben y se diseñaron 1 par de partidores para cada uno con el fin de validar los resultados obtenidos por RNAseq. Los criterios de selección de los DEGs (Expresión diferencial de genes) analizados fueron: sobreexpresión igual a  $\text{Log}(2) \text{FC} > 1$  e inhibición igual a  $\text{Log}(2) \text{FC} < -1$ , considerando un valor  $p$  ajustados  $< 0,05$ . Los partidores para los análisis de RT-qPCR se diseñaron a partir de las secuencias en formato FASTA de los DEGs seleccionados al azar utilizando la herramienta bioinformática de GenScript (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>).

La concentración de los partidores se homogeneizó a 10  $\mu\text{mol}$  tanto para la prueba en PCR convencional como para los análisis de qPCR.

**Tabla 1. Partidores para sobreexpresión en *Drepanocladus longifolius*.**

sobreexpresión		
Proteína codificante	Gen	Secuencia 5'-3'
ABC transporter	<i>ABCt</i>	GCGTACGTGGCGCAGACAGC
		GCTGTGCGCCCTTCCACCCA
Calcium-binding protein	<i>CaBP</i>	ACGTGGACGCCAACGGCGAT
		ACGAGCACGCGGTGGAGCTG
Catalase	<i>CAT</i>	AGCACCAGCGCCCTTGGCAT
		GGGTGTGAGTGGGCAGCCGTT
Cholorphyl a-b binding protein	<i>CBP</i>	GGCCCTTCTGGGCGCTCTGG
		GGCCACCGTTCACGCGGTA
Cytochrome C	<i>CYTC</i>	CACGCCCGTCACTCCGCCAA
		TGCGTGCTGACGACGCCGAT
Glutathione S-transferase	<i>GST</i>	TGCCCAAGCGCCACTCGCAT
		CCGACCAAGGAAGAGCTGCTGGA
Heat shock protein (Fragment)	<i>HSP11</i>	GCTTCGGCAGCCCGGGATTGT
		CACGCCGACCACACCCTCGT
Heat shock protein 20	<i>HSP20</i>	CAAGCGGCAGCGTCGGGAGA

		CCGCAATCCGGGCACATCGG
Heat shock protein 70	HSP70	TGTCCACGTCAGCGCCAAGG
		GCTTCGTTGCGGGCCTCGAT

**Tabla 2. Partidores para inhibición en *Drepanocladus longifolius*.**

Inhibición		
Proteína codificante	Gen	Secuencia 5'-3'
Auxin-repressed 12.5 kDa	AUXR	GAGCGACGCGCGGAGGATCA
		GCAGCGATGGACGGCGAAGC
Carbonic anhydrase	CA	GGCCCATTCGGCCCATCCGT
		TCACCCTGCCAGCGCGAGTT
Iron permease	IP	CTCGTCGCGCCAACCGACCA
		TTGATCGCCGCGGGCCTGTT
Malic enzyme	ME	CCGCCGCATCCGCGATTCAA
		AAGAGCCGGCCGCGTTTGGT
Sodium solute symporter	SSF	AGCAGCACCGCCAGACGTGA
		ATGGGCAAGAGCGGCGCCAT
Sugar efflux transporter	SET	AGTGAGCGGAGCGGCATACA
		TGCCGGCGCTTGCCTTGAGA
TMV resistance protein N-like	TMVR	AGGCTCCTCCTCGGCTTGGG
		CTGGGCAGAGGCGGTGGCAT
Translation initiation factor	TIF	CGAGGGCGCGGATGTGTTGC
		TGGCACAGCGCCTCCACGTT
Protein TONSOKU	TSK	GCCGCTCCCTACTCACACGGA
		CGAGGGCGGGCTGTGCGTAT

### 3. EXTRACCIÓN DE RNA

Las extracciones de RNA total se llevaron a cabo con el FavorPrep™ Plant Total RNA Mini kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) según las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones de protocolo en caso de que la muestra lo requiriera como la adición de  $\beta$ -Mercapto-OH en la lisis o el uso de vórtex. Cabe mencionar que se llevaron a cabo extracciones con material de prueba para aprender la metodología y mecánica base del procedimiento.

### 4. PUREZA, INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Primero se determinó la pureza del ARN con un espectrofotómetro Spectro Nano Star, usando la razón 260/280 y su respectiva concentración, usando una microplaca (LVis Plate) incorporada en el lector de la microplaca con 2 $\mu$ L de muestra en cada posillo. Los que tenían una razón de absorbancia entre 1,8 y 2 y una concentración mayor a 40 ng/ $\mu$ L se guardaron en -80 °C.

La integridad del RNA se evaluó por electroforesis con gel al 1% de agarosa empleando el método de “bleach-gel” (Aranda *et al.*, 2012), y SYBR safe como agente intercalante para visualizar RNA en gel, las muestras se corrieron por 40 minutos a 100 volts en cada experimento de electroforesis.

Las muestras almacenadas fueron cuantificadas con fluorescencia utilizando el kit Quant-iT RiboGreen RNA Assay (Invitrogen, USA) según las instrucciones del fabricante y el fluorímetro QFX Fluorometer (DeNovix, USA).

## **5. SÍNTESIS DE cDNA**

Se llevó a cabo síntesis de cDNA con ProtoScript first strand cDNA Synthesis kit de New England BioLabs, por transcripción reversa de las muestras con concentraciones de 80 ng/ $\mu$ L y pureza entre 1,8 y 2 según espectrofotómetro para probar partidores a través de PCR convencional.

El ARN con concentraciones cercanas o mayores a 50 ng/ $\mu$ L según lo medido con fluorímetro se sometió a transcripción reversa para la síntesis de cDNA con el kit High capacity cDNA Reverse Transcription de Appliedbiosystems (Thermo Fisher scientific).

## **6. PCR CONVENCIONAL Y PCR CUANTITATIVO (qPCR)**

Con el fin de comprobar la funcionalidad de los partidores diseñados, se realizaron PCR convencionales en un termociclador Kyratec utilizando el GoTaq® Green Master Mix (Promega). Las condiciones del programa de PCR fueron:

Una denaturación inicial a 95 °C por 5 min. luego 30 ciclos de; 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg (En un principio sé probo con la temperatura a 60 °C, pero no se lograba una buena polimerización, por lo que se decidió cambiarla a 55 °C) y 72

°C por 30 seg y luego de los ciclos se sometió a una extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% usando SYBRsafe como agente intercalante.

Los qPCR fueron realizados utilizando el Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) usando el siguiente programa de PCR:

Una denaturación inicial a 95 °C por 5 min luego 30 ciclos de; 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg y luego de los ciclos se sometió a una extensión final a 72 °C por 10 min.

Todas las reacciones se realizaron en un termociclador Quant studio 3. La expresión relativa de los genes se basará en el método del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001) empleando como gen de referencia el 18S rRNA.

## **7. TEST ESTADÍSTICO.**

Los resultados obtenidos en el qPCR de *D. longifolius* se sometieron a un test estadístico no paramétrico de Yuen, con el software R, con el cual se compraron las medias de los fold change de cada partidor amplificado en qPCR. Esto nos ayudó a determinar si la diferencia entre las condiciones control y experimentales en la expresión de cada gen eran estadísticamente significativas, con un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS

### ANÁLISIS RNASEQ

La información del RNAseq fue analizada según lo descrito en la metodología donde en cada especie se llevó a cabo el mismo desglose de información. En un principio se identificaron cuantos genes se sobreexpresaban, cuantos se inhibían y cuantos permanecían sin cambio bajo sus respectivas condiciones de tratamiento comparadas a las condiciones control. Dentro de los grupos de sobreexpresión e inhibición se hizo una categorización de genes, según su tipo y/o función se categorizaron como quinasas, cadenas transportadoras de electrones (CTE), estrés, transporte, metabolismo de azúcares, metabolismo de lípidos, transcripción y traducción. Los genes que no pudieron ser asociados a alguna de estas categorías se agruparon en otros y los que no fueron reconocidos en las bases de datos fueron agrupados en desconocidos.

#### *Drepanocladus longifolius*

Para *Drepanocladus longifolius* hubo 560 genes que se sobreexpresaron, la categoría otros acumulo 167 genes, estrés 76 genes, CTE 72 genes, quinasas 66 genes, transporte 61 genes, transcripción y traducción 60 genes, metabolismo de azúcares 28 genes, metabolismo de lípidos 21 genes y desconocidos 9 genes. Hubo 662 genes inhibidos, la categoría otros acumulo 170 genes, estrés 123 genes, CTE 87 genes, transporte 75 genes, metabolismo de lípidos 54 genes, metabolismo de azúcares 54 genes, transcripción y traducción 47 genes, quinasas 32 genes y desconocidos 20 genes. La figura 1 resume en un gráfico de barras el total de genes para sobreexpresión, inhibición y sin cambio. Las figuras 2 y 3 son una representación en gráfico de torta para las principales categorías de genes sobreexpresados e inhibidos respectivamente. La cantidad de genes que se inhibe es mayor por 102 a la cantidad de genes que se sobreexpresan. Todas las categorías a excepción de transcripción y traducción poseen mayor número de genes dentro del grupo inhibición.

Dentro de las categorías de genes más sobreexpresados encontramos 2 codificando para DUR3; cotransportadoras de sodio o simporters clasificados en transporte, At1g67720; receptor LRR tipo serina/ treonina proteína quinasa clasificados en quinasas, LECRKS4; dominio de lectina tipo L conteniendo receptor de quinasa S.4 clasificado en quinasa, At1g33811; GDSL esterasa/lipasa clasificado en metabolismo de lípidos, CYP707A1; perteneciente a la familia de citocromo p450. La tabla 3 corresponde a una recopilación de los 16 genes más sobreexpresados, siendo los mencionados anteriormente los que encabezan la lista con valores de  $\log(2)$  fold change mayores a 8. Así mismo, dentro de las categorías de genes más inhibidos tenemos a PYL5; proteína ciclasa/deshidratasa policetida y transportadora de lípidos clasificada en transporte, cta3; una proteína ATPase 3 transportadora de calcio, clasificada en transporte, cabll-1; complejo antena LHC clasificada en CTE, snu13; una proteína ribosomal de la familia L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 clasificada en transcripción y traducción, KLP1; una proteína de transporte tipo quinesina clasificada en transporte y Gspt2; proteína de regulación de respuesta a estímulo. La tabla 4 corresponde a una recopilación de los 12 genes más inhibidos, cuyo valor de  $\log(2)$  fold change es menor a -7 siendo los genes antes mencionados los que presentan los valores más negativos en orden ascendente.

La figura 4 corresponde a un gráfico de dispersión de los  $\log(2)$  TPM para comparar el nivel de expresión de los genes entre condiciones control y el tratamiento. Los genes agrupados en el cuadrante que representan un aumento en su nivel de expresión en las condiciones de tratamiento comparado al control están principalmente categorizados dentro de transporte, quinasas, estrés, metabolismo de lípidos y metabolismo de azúcares donde TRN1; tornado 1, TMK4; receptor tipo quinasa categorizados como transporte y quinasas respectivamente, son los más representativos. Por otro lado, dentro de las categorías de genes más representativos en el cuadrante que representa una disminución en el nivel de expresión bajo condiciones de tratamiento vs. el control, son CTE, transporte, metabolismo de lípidos, estrés y metabolismo de azúcares. Particularmente el gen COX1; citocromo oxidasa 1 categorizado como CTE, Os05g0310800; sub unidad delta-1 del coatomero categorizado como de

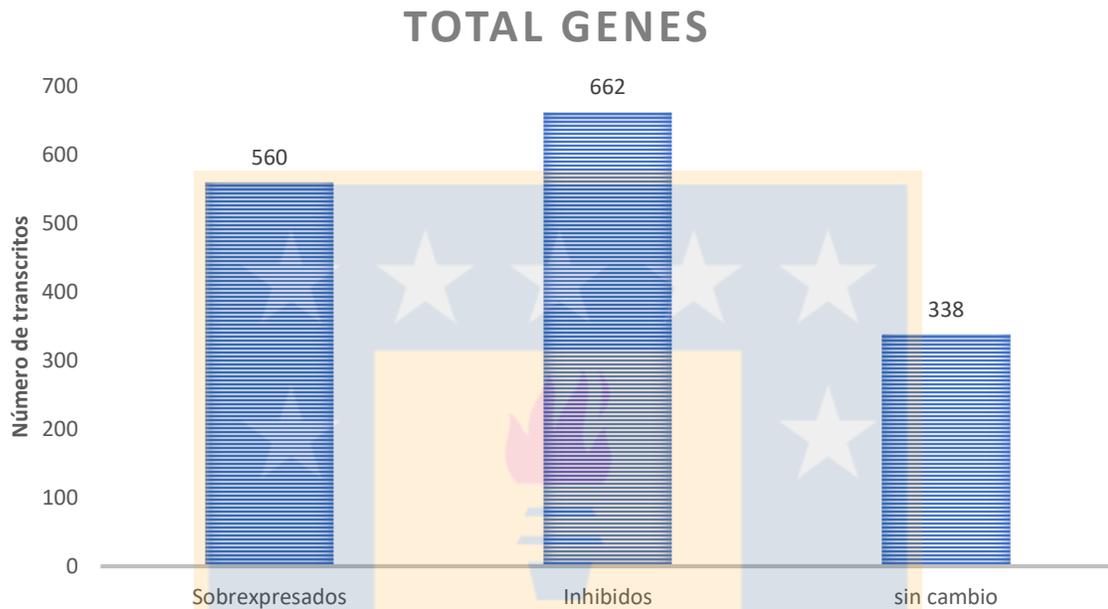
transporte, At3g28540; AAA-ATPasa categorizado como CTE, At2g36325; esteras/lipasas GDSL categorizado como metabolismo de lípidos son los más representativos en este grupo.

### *Expresión de genes relacionados a estrés*

Dentro de la categoría estrés encontramos una sobreexpresión de 76 genes, los valores de log (2) fold change más alto se registraron para inhA; isonitril hidratasa, perteneciente la familia de las chaperonas DNAj (log (2) fold change = 8,1), RPV1; proteína de resistencia a enfermedades (log (2) fold change = 7,7), At1g11960; descrita como respuesta temprana a deshidratación (log (2) fold change = 7,), P5CS2; involucrada en la biosíntesis de prolina conduciendo a la osmorregulación (log (2) fold change = 7,), gen sin ID descrito como proteína de unión a Ca (CaBP)(log (2) fold change = 4,1), TMVRN; proteína de resistencia N (log (2) fold change = 4), gen sin ID descrito como deshidrogenasa de unión a Zinc (log (2) fold change = 4). Cabe destacar que aparte de la chaperona inhA, se registró un ligero aumento en la expresión de otros 2 genes codificantes para las chaperonas; dnaj (log (2) fold change = 1,6) y Hspa12a (log (2) fold change = 1,2). A demás no se observaron genes relacionados con el metabolismo oxidativo.

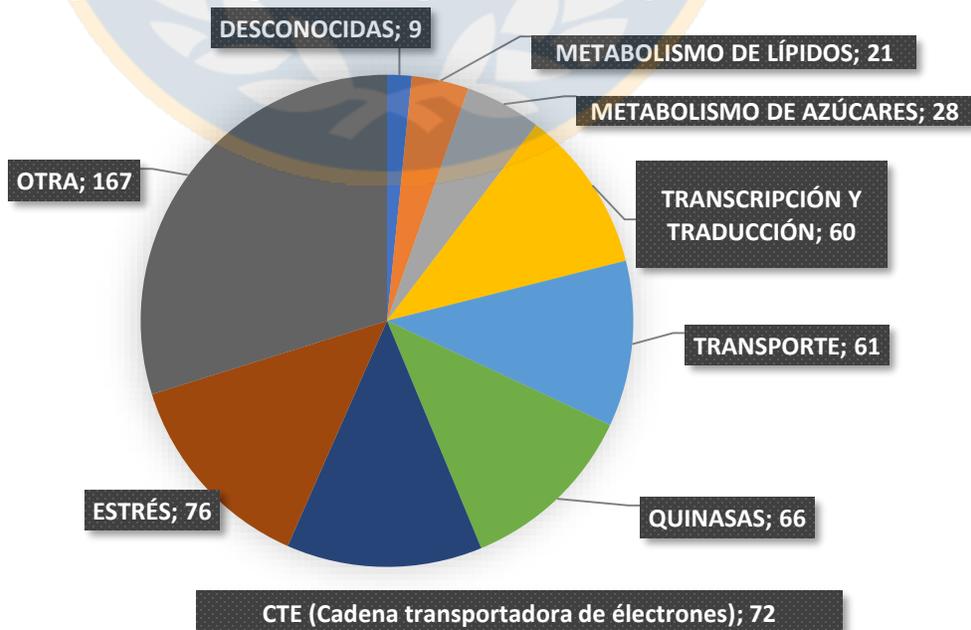
Por otro lado, de los 123 genes inhibidos en la categoría estrés, los valores de log (2) fold change más bajos se registraron para Gspt2; factor de liberación de la subunidad ERF3B de unión a GTP (log (2) fold change = -7,5), HSP70-9; proteína mitocondrial 9 de shock térmico (log (2) fold change = -7,4), SODA; superóxido dismutasa mitocondrial (log (2) fold change = -7,4), HSP18.1; proteína de shock térmico clase 1 (log (2) fold change = -4,5), katA; catalasa vegetativa (log (2) fold change = -3,9), NCED3; dioxigenasa 9-cis-epoxycarotenoide (log (2) fold change = -3,8). Cabe destacar que se encontraron 7 genes codificantes para chaperonas involucradas en la respuesta a estrés por temperatura descritas como HSPs; HSC-2, PTI12, MED37E (codificada por 2 genes), ATJ20, HSP17.9, y HSC-2, 5, 2 genes codificantes para factores de transcripción de HSPs; HSF2E, HSFA1, genes relacionados a la respuesta a bajas temperaturas involucrados en senescencia y deshidratación; ERD7, At3g51250 y P85 (codificado por 3 genes) y 3 genes

relacionados con el metabolismo oxidativo; 2 catalasas; katA y katB y un gen sin ID descrito como un componente proteico de la familia PXMP2-4 de la membrana de los peroxisomas.

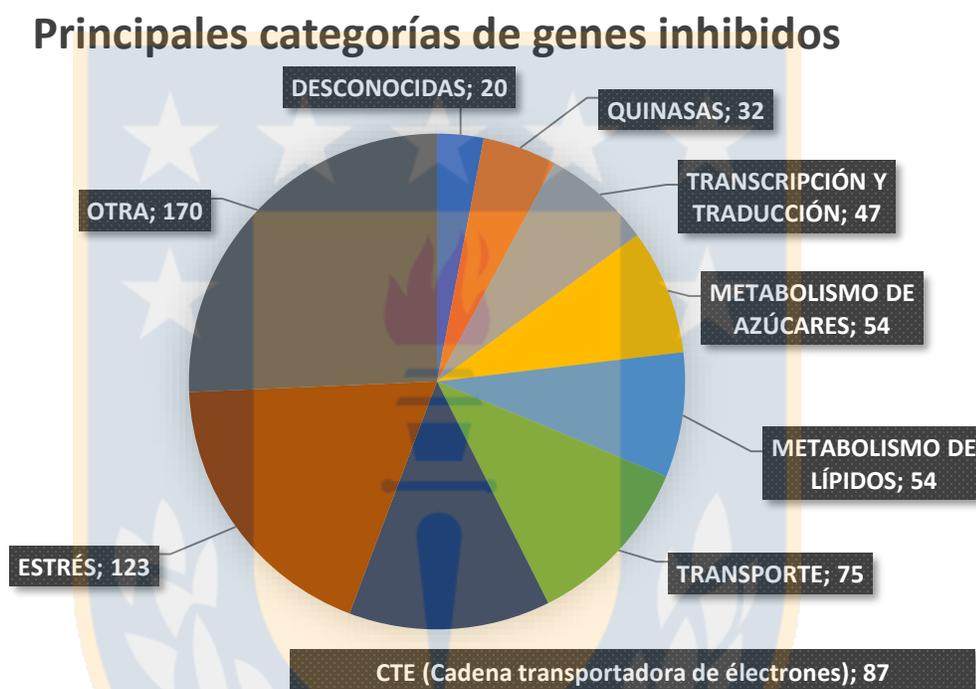


**Figura 1. Gráfico de barras del DEG de *Drepanocladus longifolius*.** De un total de 1560 genes secuenciados, 560 (35,9%) presentan una sobreexpresión, 662 (42,4%) una inhibición y 338 (21,7%) permanecieron sin cambio según el valor del log (2) fold change (barras de izquierda a derecha).

### Principales categorías de genes sobreexpresados



**Figura 2. Gráfico de torta para identificar los grupos principales de proteínas que se sobreexpresan en *Drepanocladus longifolius*.** Las categorías fueron ordenadas en el gráfico según el número total de transcritos sobre el total de genes sobreexpresados, por lo tanto, la categoría otros, corresponde a la diferencia entre el total de genes sobreexpresados y la suma del resto de categorías. Los genes dentro de la categoría otros corresponden a un 29,8%, estrés 13,6%, CTE 12,9%, quinasas 11,8%, transporte 10,9%, transcripción y traducción 10,7%, metabolismo azúcares 5% metabolismo lípidos 3,8%, desconocidos 1,6%.



**Figura 3. Gráfico de torta para identificar los grupos principales de proteínas que se inhiben en *Drepanocladus longifolius*.** Las categorías fueron ordenadas en el gráfico según el número total de transcritos sobre el total de genes inhibidos, por lo tanto, la categoría otros, corresponde a la diferencia entre el total de genes inhibidos y la suma del resto de categorías. Los genes dentro de la categoría otros corresponden a un 25,7%, estrés 18,6%, CTE 13,1%, transporte 11,3%, metabolismo lípidos 8,2, metabolismo azúcares 8,2%, transcripción y traducción 7,1%, quinasas 4,8%, desconocidos 3%.

**Tabla 3. Tabla resumen de los genes más sobreexpresados en *D. longifolius*.** La primera columna corresponde al ID del gen en la plataforma TRINITY, la segunda columna corresponde a los valores de  $\log_2$  fold change, los genes están ordenados de forma descendente en función de este valor. La tercera columna describe el nombre y/o funcionalidad del gen, y la cuarta columna corresponde a la categoría en donde se encuentra el gen en la figura 3.

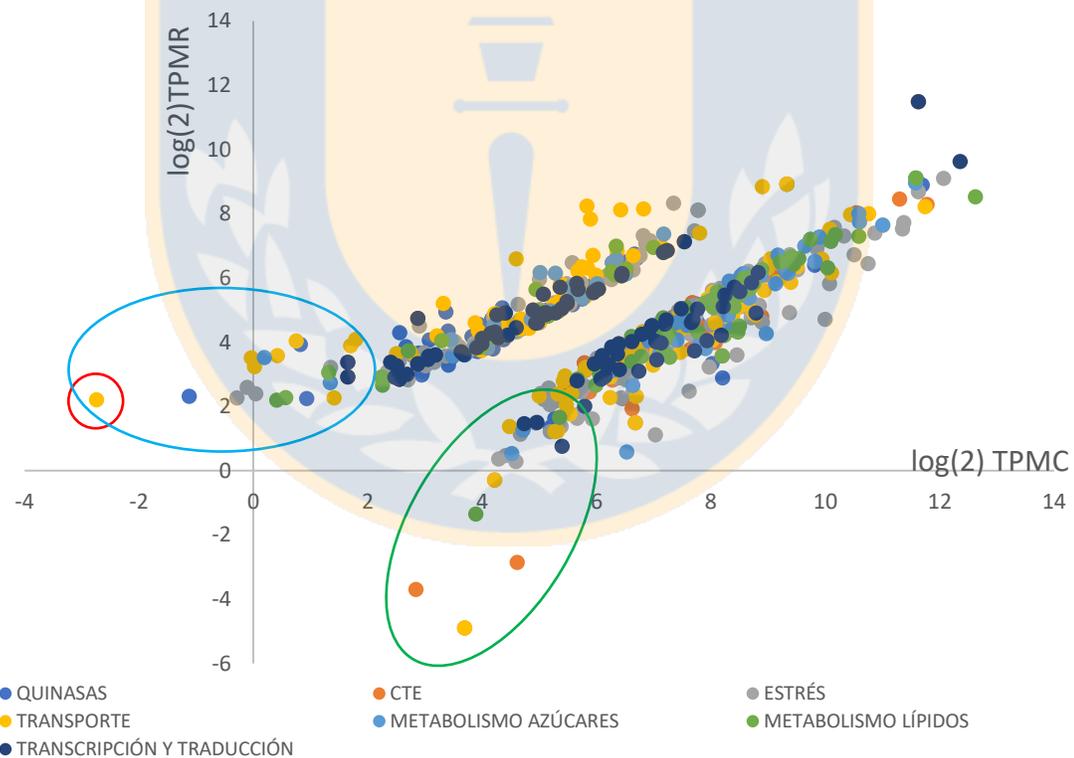
Transcriptome_ID	$\log_2$ FoldChange	Descripción	Categoría
	2		

TRINITY_DN392511_c0_g2	9,44	Belongs to the sodium solute symporter (SSF) (TC 2.A.21) family	transporte
TRINITY_DN23279_c0_g1	9,07	LRR receptor-like serine threonine-protein kinase	quinasas
TRINITY_DN392511_c0_g3	8,39	Belongs to the sodium solute symporter (SSF) (TC 2.A.21) family	transporte
TRINITY_DN9794_c0_g2	8,28	belongs to the protein kinase superfamily	quinasas
TRINITY_DN164963_c0_g1	8,15	Belongs to the 'GDSL' lipolytic enzyme family	metabolismo o lípidos
TRINITY_DN13962_c0_g3	8,10	Belongs to the cytochrome P450 family	CTE
TRINITY_DN51233_c0_g2	8,09	Isonitrile hydratase	estrés
TRINITY_DN77438_c0_g2	7,86	Sugar efflux transporter for intercellular exchange	transporte
TRINITY_DN9417_c0_g1	7,82	LRR receptor-like serine threonine-protein kinase	quinasas
TRINITY_DN10979_c0_g1	7,69	Disease resistance protein RPV1	estrés
TRINITY_DN45557_c0_g1	7,67	60S ribosomal protein L4-A	transcripción y traducción
TRINITY_DN31300_c0_g1	7,65	LRR receptor-like serine threonine-protein kinase	quinasas
TRINITY_DN26150_c0_g1	7,55	Photosystem I reaction center subunit psaK	CTE
TRINITY_DN26332_c0_g1	7,55	Photosystem I reaction center subunit V	CTE
TRINITY_DN18031_c0_g1	7,53	Quinone-oxidoreductase homolog, chloroplastic	CTE
TRINITY_DN50135_c3_g1	7,50	The light-harvesting complex (LHC) functions as a light receptor, it captures and delivers excitation energy to photosystems with which it is closely associated	CTE

**Tabla 4. Tabla resumen de los genes más inhibidos en *D. longifolius*.** La primera columna corresponde al ID del gen en la plataforma TRINITY, la segunda columna corresponde a los valores de log (2) fold change, los genes están ordenados de forma ascendente en función de este valor. La tercera columna describe el nombre y/o funcionalidad del gen, y la cuarta columna corresponde a la categoría en donde se encuentra el gen en la figura 4.

Transcriptome_ID	log2FoldChange2	Descripción	Categoría
TRINITY_DN136060_c0_g2	-8,64	Polyketide cyclase / dehydrase and lipid transport	transporte
TRINITY_DN18331_c0_g2	-7,78	Calcium-transporting ATPase 3	transporte
TRINITY_DN17960_c3_g1	-7,69	The light-harvesting complex (LHC) functions as a light receptor	CTE
TRINITY_DN78917_c0_g2	-7,67	Ribosomal protein	transcripción y

			traducción
TRINITY_DN33559_c0_g1	-7,59	Kinesin-like protein KLP1	transporte
TRINITY_DN580946_c0_g1	-7,50	regulation of response to stimulus	estrés
TRINITY_DN20560_c0_g4	-7,48	ribosomal protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN288288_c0_g2	-7,47	Belongs to the mitochondrial carrier (TC 2.A.29) family	CTE
TRINITY_DN144301_c0_g1	-7,43	Belongs to the heat shock protein 70 family	estrés
TRINITY_DN22013_c0_g2	-7,38	40S ribosomal protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN14250_c0_g1	-7,37	Superoxide dismutase [Mn]	estrés
TRINITY_DN612135_c0_g1	-7,18	Coatomer subunit delta-1	transporte



**Figura 4. Gráfico de dispersión para el log (2) de los TPM del RNAseq de *Drepanocladus longifolius*.** Este gráfico es una visualización del cambio en la expresión diferencial entre condiciones, control (eje x) y tratamiento (eje y). Las categorías de genes fueron diseñadas a partir de la función y/o tipo de proteína que codificaba el gen. El número de categorías resultantes fue 7;

Quinasas, transporte, transcripción y traducción, cadenas transportadoras de electrones (CTE), metabolismo de azúcares, estrés y metabolismo de lípidos. Mientras más alto sé el valor en cada eje, más alto es el cambio en el nivel de expresión de los genes representados en esa área y viceversa. Por ejemplo: existe un cambio (aumento en este caso) en condiciones de tratamiento vs. control en la expresión del gen codificante para la proteína TRN1; tornado 1 relacionada con el transporte de auxinas, encerrada en un círculo rojo. El grupo de genes en el círculo celeste son los que poseen un valor significativamente más alto en su expresión en condiciones de tratamiento en contraste al control. El grupo de genes en el círculo verde son los que poseen un valor más significativo de expresión en el control a comparación del tratamiento.

### *Cymodocea nodosa*

Para *Cymodocea nodosa* hubo 137 genes que se sobreexpresaron, la categoría transcripción y traducción acumulo 31 genes, quinasas 27 genes, estrés 24 genes, transporte 23 genes, metabolismo de lípidos 14 genes, metabolismo de azúcares 10 genes, CTE 7 genes y desconocidos 1 gen. Hubo 151 genes inhibidos, la categoría transcripción y traducción acumulo 56 genes, CTE 27 genes, estrés 23 genes, transporte 15 genes, metabolismo de azúcares 9 genes, otros 9 genes, metabolismo de lípidos 5 genes, quinasas 4 genes, desconocidos 3 genes. La figura 5 resume en un gráfico de barras el total de genes para sobreexpresión, inhibición y sin cambio. Las figuras 6 y 7 son una representación en gráfico de torta para las principales categorías de genes sobreexpresados e inhibidos respectivamente. La cantidad de genes que se inhibe es mayor por 14 a la cantidad de genes que se sobreexpresan. Las categorías de genes que más se sobreexpresan comparados a su inhibición son transporte, metabolismo de lípidos, quinasas. Las categorías que más se inhiben comparados a su sobreexpresión son transcripción y traducción (sobrerrepresentada por genes ribosomales), CTE. Las categorías metabolismo de azúcares, y estrés arrojaron un número similar de genes.

Dentro de los genes más sobreexpresados basándonos en el valor del log (2) fold change, encontramos dlc1; cadena liviana de dineina 1 categorizado como transporte, DGL; galactolipasa DONGLE categorizado como metabolismo de lípidos, TY3-1; transposon categorizado como transcripción y traducción, y GP210; proteína del complejo de poros nucleares caracterizado como transcripción y

traducción. La tabla 5 corresponde a una recopilación de los 17 genes más sobreexpresados, siendo los 4 mencionados anteriormente los que ocupan el primer lugar en orden descendente. Así mismo dentro de las categorías de genes más inhibidos tenemos a RPS16; 40S proteína ribosomal S16 categorizado como transcripción y traducción, NPC2; fosfatidil glicerol/ fosfatidil inositol transferasa categorizado como metabolismo de lípidos, RPS19B; proteína ribosomal 40S S19-2 categorizada como transcripción y traducción, RPL32A; proteína ribosomal 60S L32-1 categorizado como transcripción y traducción. La tabla 6 corresponde a una recopilación de los 14 genes más inhibidos, donde estos mencionados anteriormente son los que encabezan la lista.

### *Expresión de genes relacionados a estrés*

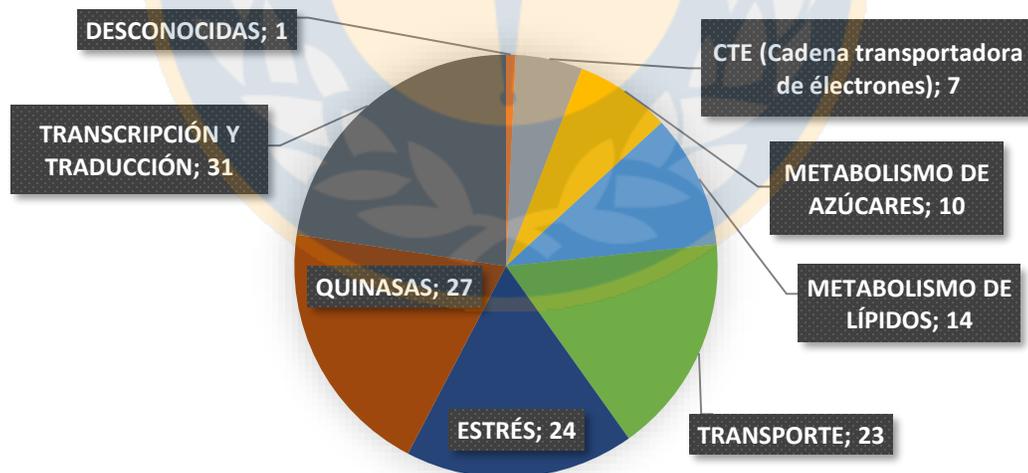
Dentro de la categoría estrés observamos 24 genes sobreexpresándose dentro de los cuales podemos destacar At5g11310, At3g49730, At4g20090, At5g01110 y At5g14770 que codifican para proteínas con el motivo pentatricopeptido repetido cuya función está asociada a la protección del genoma de los organelos y la biosíntesis de organelos (Manna, S. 2015), DREB1A descrito como un elemento de respuesta a la deshidratación de unión a la proteína 1A, GST correspondiente a glutatión s transferasa y GSVIVT00037159001 correspondiente a peroxidasa que están involucrados en el metabolismo de estrés oxidativo, CLPB3 correspondiente a una proteína chaperona. Dentro de los genes inhibidos encontramos PRL-1 proteína tirosina fosfatasa que se ha descrito tiene un rol en la defensa de las plantas, dnajd2, HSP21, hspB pertenecientes a la familia de las proteínas chaperonas, AMC4; involucrada en procesos de apoptosis, APX2 y CAT1 involucradas en el metabolismo de estrés oxidativo, SEP2; descrita como proteína mejorada para estrés, At5g05600; dioxigenasa 2-oxoglutarato dependiente, involucrada en la oxidación de jasmonato en respuesta a estrés inducido por fitohormonas sintetizadas en respuesta al ataque de patógenos.

## TOTAL GENES



**Figura 5. Gráfico de barras del DEG de *Cymodocea nodosa*.** De un total de 1123 genes secuenciados, 137 (12,1%) presentan una sobreexpresión, 151 (13,4%) una inhibición y 835 (74,5%) permanecieron sin cambio según el valor del log (2) fold change (barras de izquierda a derecha).

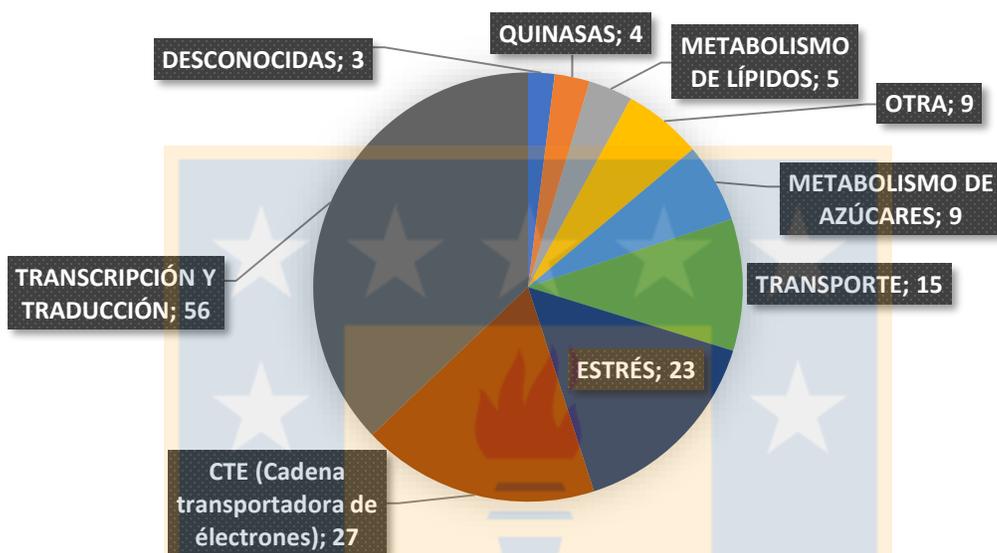
## Principales categorías de genes sobreexpresados



**Figura 6. Gráfico de torta para identificar los grupos principales de proteínas que se sobreexpresan en *Cymodocea nodosa*.** Las categorías fueron ordenadas en el gráfico según el número total de transcritos sobre el total de genes sobreexpresados, por lo tanto, la categoría otros, corresponde a la diferencia entre el total de genes sobreexpresados y la suma del resto de

categorías. Los genes dentro de la categoría transcripción y traducción corresponden a un 22,6%, quinasas 19, 7%, estrés 17,5%, transporte 16,8%, metabolismo lípidos 10,2%, metabolismo azúcares 7,3%, CTE 5,1%.

## Principales categorías de genes inhibidos



**Figura 7. Gráfico de torta para identificar los grupos principales de proteínas que se inhiben en *Cymodocea nodosa*.** Las categorías fueron ordenadas en el gráfico según el número total de transcritos sobre el total de genes inhibidos, por lo tanto, la categoría otros, corresponde a la diferencia entre total de genes inhibidos y la suma del resto de categorías. Los genes dentro de la categoría transcripción y traducción representan un 37,1%, CTE 17,9%, estrés 15,2%, transporte 9,9%, otros 6%, metabolismo azúcares 6%, metabolismo lípidos 3,3%, quinasas 2,6%.

**Tabla 5. Tabla resumen de los genes más sobreexpresados en *C. nodosa*.** La primera columna corresponde al ID del gen en la plataforma TRINITY, la segunda columna corresponde a los valores de log (2) fold change, los genes están ordenados de forma descendente en función de este valor. La tercera columna describe el nombre y/o funcionalidad del gen, y la cuarta columna corresponde a la categoría en donde se encuentra el gen en la figura 7.

Transcriptome_ID	log2FoldChange	Descripción	Categoría
TRINITY_DN6448_c0_g1	6,98	Dynein light chain 1	transporte
TRINITY_DN49649_c0_g1	6,55	Galactolipase DONGLE	metabolismo lípidos
TRINITY_DN88818_c0_g1	6,24	Transposon Ty3-I Gag-Pol polyprotein	transcripción y traducción
TRINITY_DN23949_c0_g1	6,05	Nuclear pore complex protein	transcripción y traducción

TRINITY_DN73940_c0_g1	4,46	Protein BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY	estrés
TRINITY_DN8882_c0_g2	4,07	Anaphase-promoting complex subunit 4	transcripción y traducción
TRINITY_DN14047_c0_g1	3,88	Cyclin-A2-1	quinasas
TRINITY_DN4306_c1_g1	3,74	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	quinasas
TRINITY_DN19434_c0_g2	3,69	Kinesin-like protein	transporte
TRINITY_DN23281_c0_g1	3,30	Kinesin-like protein	transporte
TRINITY_DN2586_c0_g1	3,19	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain	transcripción y traducción
TRINITY_DN789_c1_g1	3,09	Uncharacterized protein	desconocida
TRINITY_DN1065_c1_g6	3,03	Pectinesterase	metabolismo azúcares
TRINITY_DN49989_c0_g1	2,94	3-ketoacyl-CoA synthase	metabolismo lípidos
TRINITY_DN33250_c0_g1	2,77	Pentatricopeptide repeat-containing protein	estrés
TRINITY_DN8125_c0_g2	2,75	Anaphase-promoting complex subunit 1	transcripción y traducción
TRINITY_DN28751_c0_g3	2,58	Probable cellulose synthase A catalytic subunit 8 [UDP-forming]	metabolismo azúcares

**Tabla 6. Tabla resumen de los genes más inhibidos en *C. nodosa*.** La primera columna corresponde al ID del gen en la plataforma TRINITY, la segunda columna corresponde a los valores de log (2) fold change, los genes están ordenados de forma ascendente en función de este valor. La tercera columna describe el nombre y/o funcionalidad del gen, y la cuarta columna corresponde a la categoría en donde se encuentra el gen en la figura 8.

Transcriptome_ID	log2FoldChange	Descripción	Categoría
TRINITY_DN100093_c0_g1	-7,12	40S ribosomal protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN7981_c0_g1	-7,05	Phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein 1	metabolismo lípidos
TRINITY_DN26385_c0_g1	-6,98	40S ribosomal protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN11311_c0_g3	-6,87	60S ribosomal protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN18258_c0_g1	-6,78	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial	metabolismo lípidos
TRINITY_DN34834_c0_g1	-6,78	General transcription factor IIE subunit 2	transcripción y traducción

			traducción
TRINITY_DN6879_c0_g2	-6,65	Fructose-1,6-bisphosphatase 1, chloroplastic	metabolismo azúcares
TRINITY_DN5830_c0_g1	-6,65	Protein tyrosine phosphatase	estrés
TRINITY_DN48062_c0_g1	-6,64	Adenosylhomocysteinase	transcripción y traducción
TRINITY_DN9942_c0_g1	-6,51	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3	transcripción y traducción
TRINITY_DN10808_c0_g2	-6,50	Tyrosine--tRNA ligase 1	transcripción y traducción
TRINITY_DN13042_c0_g1	-6,34	Membralin-like protein At1g60995	transcripción y traducción
TRINITY_DN32230_c0_g1	-6,17	60S acidic ribosomal protein P1	transcripción y traducción
TRINITY_DN47304_c0_g1	-5,65	60S ribosomal protein	transcripción y traducción

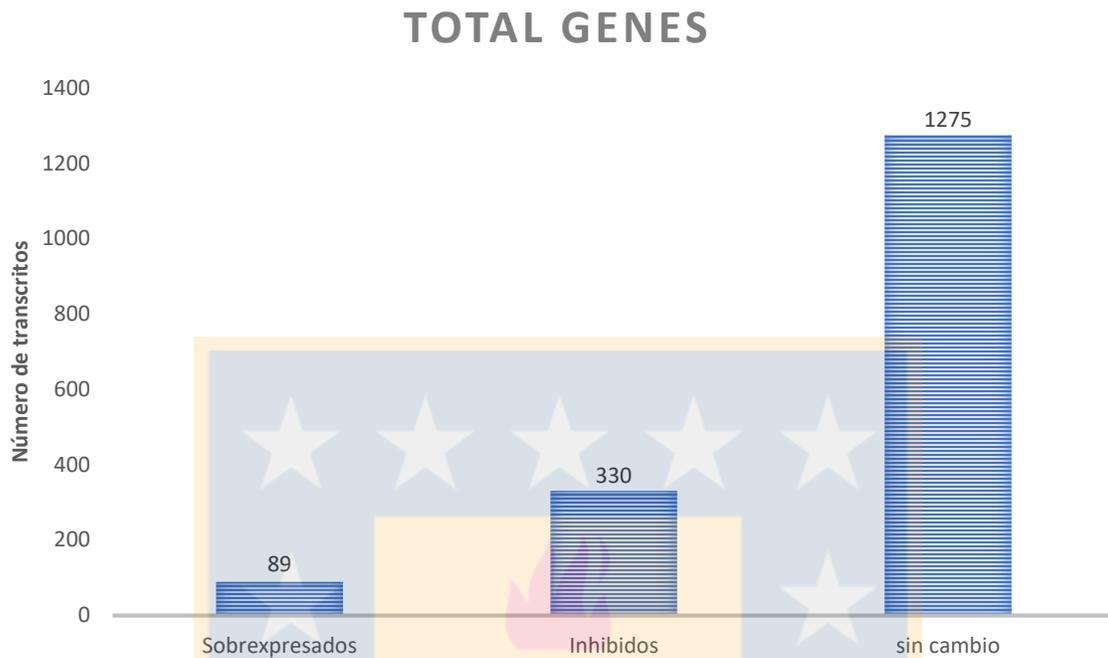
### *Posidonia oceanica*

Para *Posidonia oceanica* hubo un total de 89 genes sobreexpresados, las principales categorías fueron transcripción y traducción con 42 genes, CTE con 12 genes, estrés con 10 genes. Hubo un total de 330 genes inhibidos, donde las categorías principales fueron transcripción y traducción con 84 genes, estrés con 52 genes, CTE con 50 genes y transporte con 39 genes. La figura 8 corresponde a un gráfico de barras donde se resume el total de genes sobreexpresados, inhibidos y sin cambio según el valor del  $\log_2$  fold change. Las figuras 9 y 10 corresponden a una representación en gráfico de tortas para el número total de genes en cada categoría para los sobreexpresados e inhibidos respectivamente. La diferencia entre la cantidad de genes sobreexpresados e inhibidos es de 241 genes. Las categorías de genes inhibidos concentran el mayor número de genes, en comparación a sus respectivas categorías en sobreexpresión, al ordenar las categorías de manera descendente en cada caso, se observa el mismo patrón. La tabla 7 corresponde a un resumen de los 9 genes con mayores valores de  $\log_2$  fold change. Dentro de estos genes encontramos PCKR1; PPlasa que acelera el

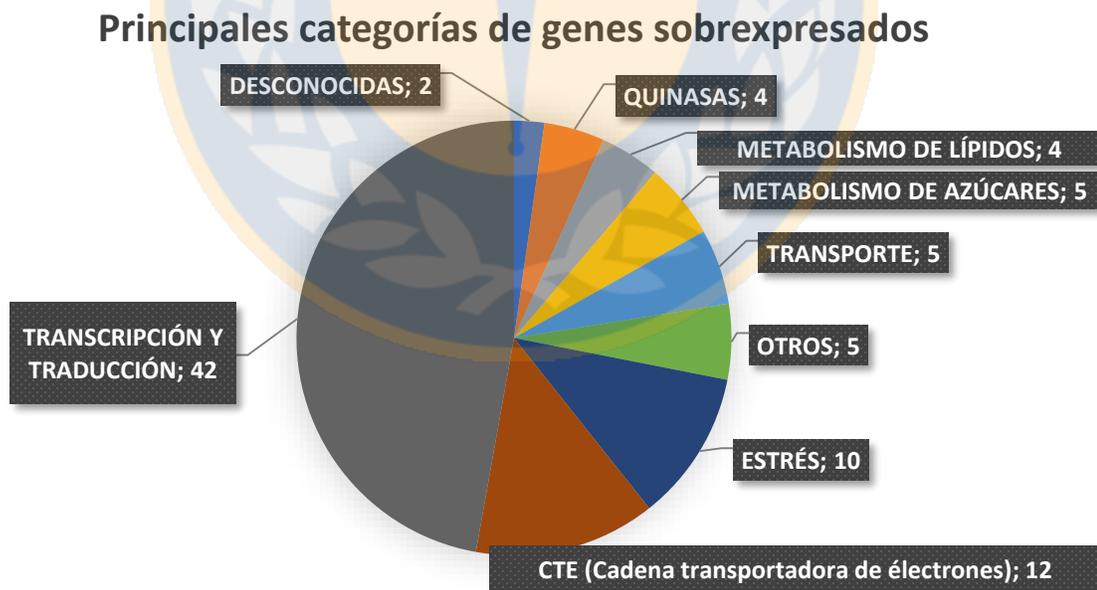
plegamiento de proteínas categorizado como estrés, NAT6; transportador de ascorbato-nucleobase categorizado como transporte, At1g80640; receptor tipo proteína quinasa categorizado como quinasa, SUMO1; modificador pequeño relacionado con ubiquitina categorizado como transcripción y traducción. Por otra parte, en la tabla 8, tenemos un resumen de los 17 genes con menores valores de log (2) fold change. Dentro de estos genes encontramos NPC4; fosfolipasa no específica categorizada como metabolismo de lípidos, AOX1A; ubiquinol oxidasa 1a categorizado como CTE, LHCSR1; proteína relacionada con estrés 1 del complejo antena categorizada como CTE, Os01g0651100; fosfolipasa A1-II categorizada como metabolismo de lípidos, At5g63180; pectato liasa categorizada como metabolismo de azúcares y MT-CO3; subunidad 3 de citocromo c oxidasa categorizada como CTE.

### *Expresión de genes relacionados a estrés*

Dentro de la categoría estrés, encontramos que hubo una sobreexpresión en 10 genes, dentro de los cuales tenemos a PCKR1; involucrada en la aceleración del plegamiento de las proteínas, WIN2 proteína inducida por heridas, EXL2 que tiene un rol en la regulación de brassinoesteroides relacionados con crecimiento y desarrollo, ABI5 proteína de insensibilidad al ácido abscísico, APSR1 relacionada con la respuesta del déficit de fósforo, CPN60A1 subunidad alfa 1 de la chaperonina 60 que está involucrada en el plegamiento de proteínas denaturadas por aumento de temperatura. Por otra parte, se registró una inhibición de 52 proteínas relacionadas con estrés, dentro de las cuales tenemos las chaperonas HSP70, CLPD, ATJ6 y BCS1 (chaperona mitocondrial). GAD1 descrita como glutamato descarboxilasa involucrada en la catálisis de glutamato en respuesta a estrés por temperatura. PAP20, PAP15 y PAP3 descritas como fosfatasa de ácido púrpura, involucradas en la respuesta a déficit de fósforo. GGAT1 descrita como glutamato glioxilato aminotransferasa 1 involucrada en la catálisis de glutamato en los peroxisomas en respuesta a estrés oxidativo. DTX46, descrita como proteína detoxificante 46, es un antiporero involucrada en la expulsión de compuestos tóxicos en cloroplastos y mitocondrias.



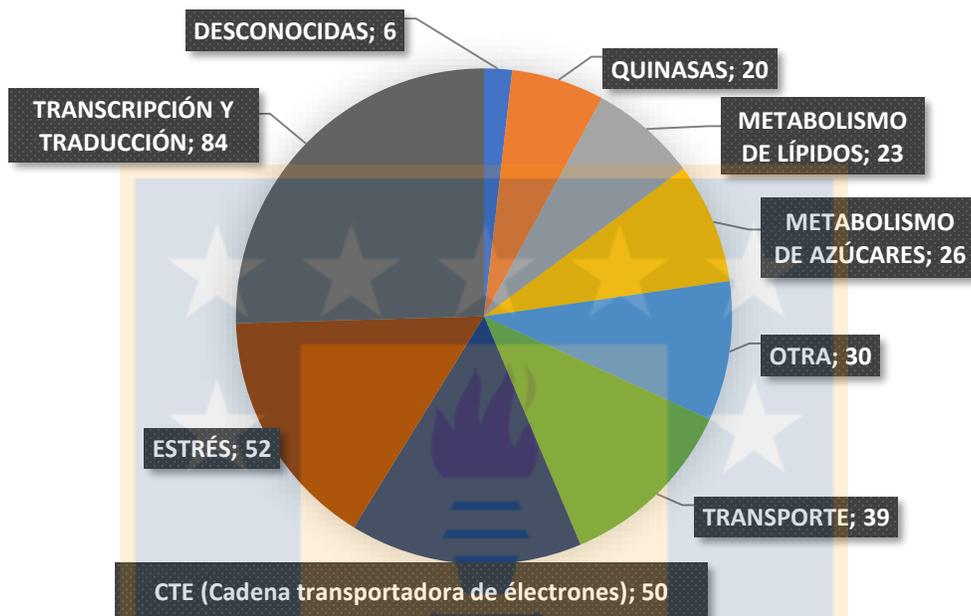
**Figura 8. Gráfico de barras del DEG de *Posidonia oceanica*.** De un total de 1694 genes secuenciados, 89 (5,2%) presentan una sobreexpresión, 330 (19,5%) una inhibición y 1275 (75,3%) permanecieron sin cambio según el valor del log (2) fold change (barras de izquierda a derecha).



**Figura 9. Gráfico de torta para identificar los grupos principales de proteínas que se sobreexpresaron en *Posidonia oceanica*.** Las categorías fueron ordenadas en el gráfico según el número total de transcritos sobre el total de genes sobreexpresados, por lo tanto, la categoría otros, corresponde a la diferencia entre total de genes sobreexpresados y la suma del resto de

categorías. La categoría transcripción y traducción representa un 47,2%, CTE un 13,5%, estrés 11,24%, otros un 5,6%, transporte 5,6%, metabolismo de azúcares 5,6%, metabolismo de lípidos 4,5%, quinasas 4,5%, desconocidas 2,3%.

## Principales categorías de genes inhibidos



**Figura 10.** Gráfico de torta para identificar los grupos principales de proteínas que se inhiben en *Posidonia oceanica*. Las categorías fueron ordenadas en el gráfico según el número total de transcritos sobre el total de genes inhibidos, por lo tanto, la categoría otros, corresponde a la diferencia entre total de genes inhibidos y la suma del resto de categorías. La categoría transcripción y traducción corresponde a un 25,5%, estrés 15,8%, CTE 15,2%, transporte 11,8%, otros 9,1%, metabolismo de azúcares 7,9%, metabolismo de lípidos 7%, quinasas 6,1% y desconocidas 1,8%.

**Tabla 7.** Tabla resumen de los genes más sobreexpresados en *P. oceanica*. La primera columna corresponde al ID del gen en la plataforma TRINITY, la segunda columna corresponde a los valores de  $\log_2$  fold change, los genes están ordenados de forma descendente en función de este valor. La tercera columna describe el nombre y/o funcionalidad del gen, y la cuarta columna corresponde a la categoría en donde se encuentra el gen en la figura 10.

Transcript_ID	log2FoldChange	Descripción	Categoría
TRINITY_DN9725_c0_g2	6,78	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	estrés
TRINITY_DN8385_c0_g1	5,72	Nucleobase-ascorbate transporter	transporte

TRINITY_DN4_c0_g4	4,93	Probable receptor-like protein kinase	quinasas
TRINITY_DN97851_c0_g1	4,60	Small ubiquitin-related modifier	transcripción y traducción
TRINITY_DN3486_c1_g2	4,50	Probable dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 3B	metabolismo o azúcares
TRINITY_DN8613_c0_g1	4,11	40S ribosomal protein	ribosomal
TRINITY_DN10778_c0_g1	3,95	Agamous-like MADS-box protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN8568_c0_g1	3,07	Triacylglycerol lipase	metabolismo o lípidos
TRINITY_DN8409_c0_g1	2,45	Wound-induced protein	estrés

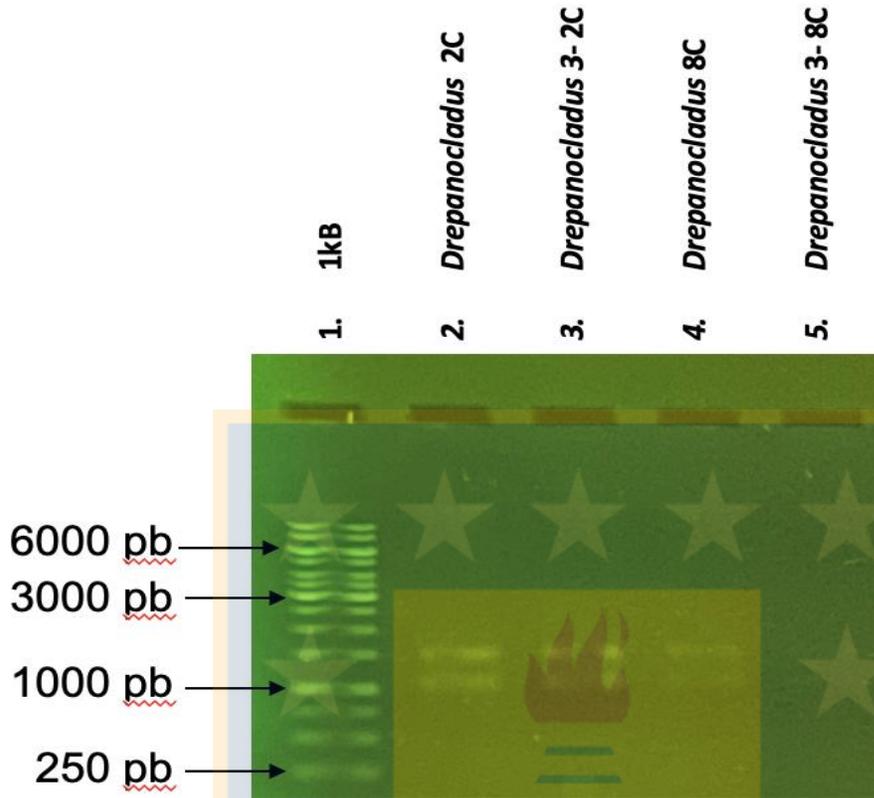
**Tabla 8.** Tabla resumen de los genes más inhibidos en *P. oceanica*. La primera columna corresponde al ID del gen en la plataforma TRINITY, la segunda columna corresponde a los valores de log (2) fold change, los genes están ordenados de forma ascendente en función de este valor. La tercera columna describe el nombre y/o funcionalidad del gen, y la cuarta columna corresponde a la categoría en donde se encuentra el gen en la figura 11.

Transcript_ID	log2FoldChange	Descripción	Categoría
TRINITY_DN1128_c0_g1	-11,45	Non-specific phospholipase	metabolismo lípidos
TRINITY_DN8746_c1_g1	-9,95	Ubiquinol oxidase 1a, mitochondrial	CTE
TRINITY_DN9021_c0_g1	-9,44	Phospholipase	metabolismo lípidos
TRINITY_DN1283_c1_g1	-9,13	Probable pectate lyase	metabolismo azúcares
TRINITY_DN4580_c1_g1	-8,50	Light-harvesting complex stress-related protein 1	CTE
TRINITY_DN107577_c0_g1	-8,17	Cytochrome c oxidase subunit 3	CTE
TRINITY_DN9690_c1_g3	-8,09	Profilin-3	estrés
TRINITY_DN9155_c1_g1	-8,08	RNA cytidine acetyltransferase	transcripción y traducción
TRINITY_DN26040_c0_g1	-7,77	Putative AC transposase	transcripción y traducción
TRINITY_DN98702_c0_g1	-7,53	Glutamate--glyoxylate aminotransferase	estrés
TRINITY_DN51754_c2_g1	-7,40	60S ribosomal protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN152936_c0_g1	-7,35	Probable S-adenosylmethionine carrier 2	transporte
TRINITY_DN12360_c0_g2	-7,33	Transketolase	metabolismo azúcares
TRINITY_DN72757_c0_g1	-7,30	Autophagy-related protein	transporte

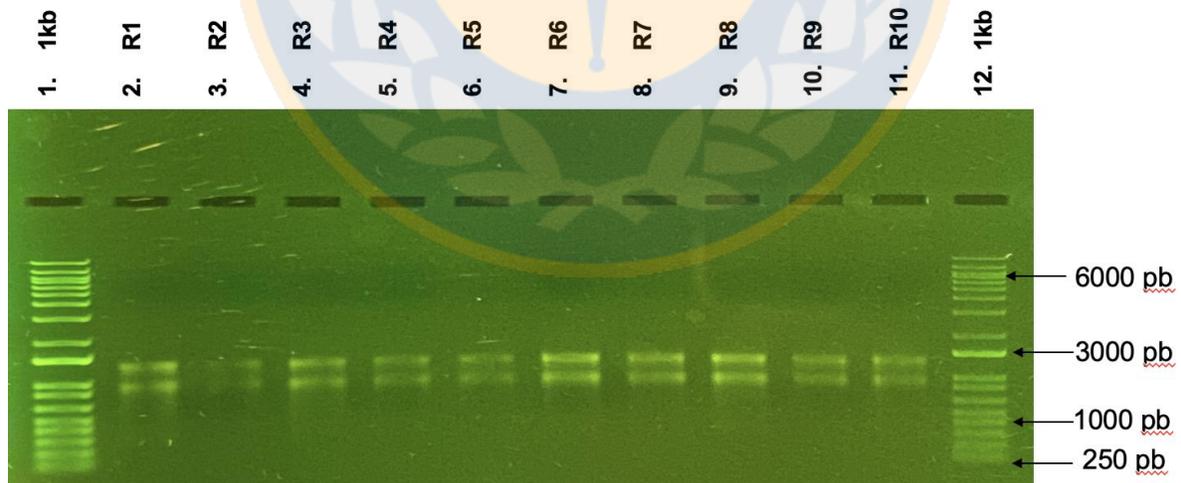
TRINITY_DN8865_c0_g1	-7,26	60S acidic ribosomal protein	transcripción y traducción
TRINITY_DN12240_c0_g1	-6,64	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase, mitochondrial	quinasas
TRINITY_DN107368_c0_g1	-6,64	Probable serine/threonine-protein kinase	quinasas

## EXTRACCIONES Y CUANTIFICACION

El RNA extraído de las muestras de *D. longifolius* tuvo una evaluación inicial de pureza y concentración mediante absorbancia, usando un espectrofotómetro, se seleccionaron las muestras con una pureza de mínimo 1,8 y concentración mayor a 40 ng/μL. Posteriormente se midió la integridad del RNA mediante un gel de agarosa con cloro (método bleach-gel) al 1x con un marcador de peso molecular de 1kb. Se corrieron las muestras por 40 minutos a 100, en el gel de la figura 11 se observa en el primer pocillo el marcador de peso molecular y en los siguientes las muestras de 2 y 8 °C respectivamente donde se observa una doble banda de RNA en cada pocillo. La banda superior corresponde al RNA 28S y la inferior al 18S. Finalmente, se llevó a cabo una cuantificación de alta precisión con el uso de un fluoroforo como se describe en la metodología, en la tabla 8 se resumen y comparan los resultados obtenidos mediante espectrofotómetro y mediante fluorescencia de los RNA extraídos. Para las muestras de 2 °C se lograron obtener 3 con pureza y concentración dentro de los rangos esperados. Para las muestras de 8 °C solo 2 se obtuvieron con purezas y concentraciones dentro de los rangos esperados.



**Figura 11. Electroforesis ARN (método bleach-gel).** Muestras de *D. longifolius* del tratamiento a 2 °C en los pocillos 2 y 3. Muestras de *D. longifolius* del tratamiento a 8 °C en los pocillos 4 y 5. Corridas por 40 minutos a 100 V. Cada pocillo se cargo con 2  $\mu$ L de RNA y 2  $\mu$ L de buffer de carga.



**Figura 12. Electroforesis ARN (método bleach-gel).** Muestras de *D. longifolius* del tratamiento a 8 °C. Corridas por 40 minutos a 100 V. cada pocillo se cargo con 2  $\mu$ L de RNA y 2  $\mu$ L de buffer de carga

**Tabla 14. Comparación entre la concentración de RNA obtenido por absorbancia vs. Fluorescencia.**

Nº etiqueta	Especie	Tratamiento (Tº)	Razón 260/280	[RNA] Absorbancia (ng/µL)	[RNA] Fluorímetro (ng/µL)
10	<i>Drepanocladus longifolius</i>	2 °C	1,9	109	113,9
11	<i>Drepanocladus longifolius</i>	2 °C	1,93	225	219,5
12	<i>Drepanocladus longifolius</i>	2 °C	1,91	206	154,3
13*	<i>Drepanocladus longifolius</i>	8 °C	1,9	99	88,5
16	<i>Drepanocladus longifolius</i>	8 °C	1,82	42	43,9

### **PRUEBA DE PARTIDORES (PCR CONVENCIONAL)**

Los partidores fueron probados con RNA de musgo extraído de biomasa destinada a usos de prueba. Los parámetros de pureza fueron de mínimo 1,8 y concentración mayor a 40 ng/µL, determinados mediante absorbancia con un espectrofotómetro.

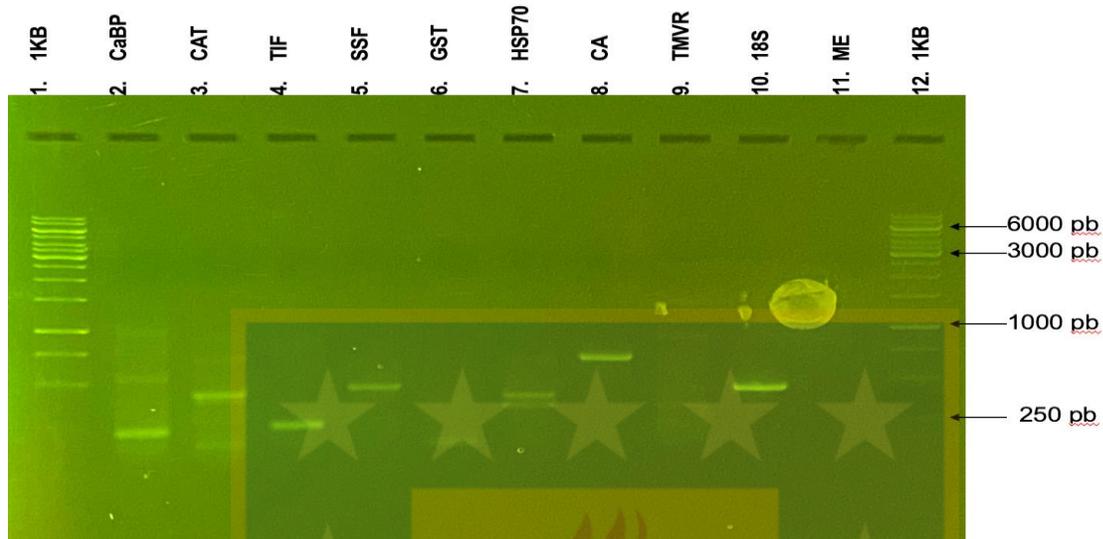
La síntesis de cDNA se llevó a cabo calculando el volumen necesario de RNA para alcanzar una concentración de 500 ng/µL. Se usó el partidador 18S específico para musgo como control positivo. El programa de PCR se detalla en la metodología. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5%. Como referencia se usó el marcador de peso molecular de 1Kb.

En ambas pruebas de partidores se corroboró una correcta síntesis de cDNA mediante la visualización del control positivo en el gel sobre los 250 pb.

En el primer PCR se obtuvieron resultados preliminarmente positivos para 9 genes; CaBP, CAT, TIF, SSF, GST, HSP70, CA, TMVR y ME. Posteriormente, se llevó a cabo otra reacción de PCR, pero solo con los genes que habían tenido buenos resultados preliminares. En la figura 12 se observa el gel con la visualización de los productos de PCR de prueba de los 9 genes amplificados por segunda vez.

Con estos resultados se especuló que los productos que se encontraban bajo los 250 pb podrían corresponder a dímeros de primer, y que particularmente en el

caso de ME en una primera instancia se podría haber malinterpretado en el gel una banda de dímeros de primer como un producto amplificado de PCR.



**Figura 12. Prueba de partidores de *D. longifolius*.** Gel de agarosa 1,5%, 45 minutos a 100 Volts. (PCR 35 ciclos).

### qPCR de validación RNAseq *D. longifolius*

Se llevó a cabo síntesis de cDNA con las muestras de RNA de *D. longifolius* señaladas en la tabla 8. Para el caso de las muestras a 8 °C, solo se lograron los estándares de pureza mayor a 1,8 y concentraciones mayores a 40 ng/μL para dos muestras, por lo que la muestra 13 marcada con un asterisco en la tabla 8 se utilizó como fuente para 2 cDNAs. Se llevaron a cabo las reacciones según lo especificado en la sección de metodología, usando como gen normalizador el partidor 18s específico de musgo. Se calcularon los valores de Fold change con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  donde los valores de Ct para las muestras de 2 °C en cada gen se promediaron y se usó este promedio para obtener un valor de fold change para cada una de las 3 muestras de tratamiento a 8 °C de cada gen. Los valores de fold change de las muestras de 2 °C se igualaron a 1.

Posteriormente, se construyeron dos tipos de matrices en Excel, una para el análisis estadístico en R y para los gráficos de las figuras 5. La matriz para el test estadístico consistía en ordenar los datos en 3 columnas: la primera columna correspondía al nombre del gen, la segunda correspondía al grupo; control o tratamiento, y la última columna correspondía al valor de fold change de cada

grupo. Las matrices de los gráficos de barra de la figura 5 A-F consistían en las mismas 3 columnas antes mencionadas, pero en el caso de la columna grupo se agregó el grupo de RNAseq y en la columna fold change su respectivo valor. Para cada gen se construyó una matriz.

### TEST ESTADÍSTICO

En respuesta a un aumento de temperatura de 6 °C, el gen codificando ME sobreexpresaba de manera significativa (test de Yuen, t-stat = -3,5, p-value < 0,05; Tabla 15, Figura 5A). Por otro lado, los genes codificando CAT y GST demostraron una inhibición significativa entre el tratamiento y el control (test de Yuen, t-stat (CAT) = 36,52, t-stat (GST)= 54,02 p-value (CAT y GST) < 0,05; Tabla 15, Figura 13C y 13D respectivamente). Por otra parte, los genes que codifican CA, CaBP y TIF no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa en su nivel de expresión en el tratamiento respecto al control.

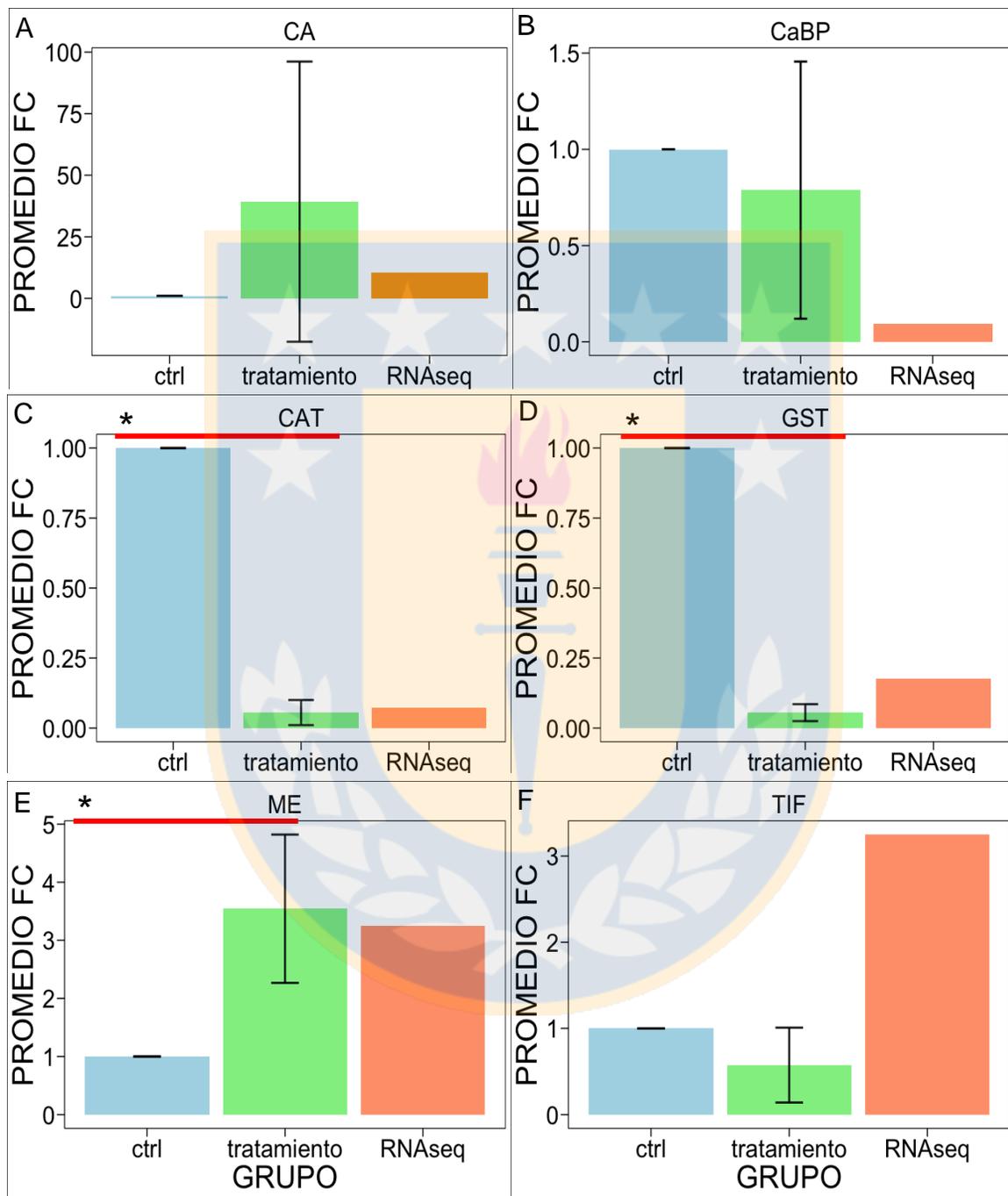
Observamos una concordancia entre lo que nos indica el valor de Fold Change del qPCR y RNAseq para los genes que codifican para CA, CaBP, CAT, GST y ME (Figura 13 A-E), pero en el caso del gen que codifica el TIF, observamos una sobreexpresión en el valor de Fold Change del RNAseq y una inhibición en el valor de Fold Change del qPCR (Figura 13F).

Finalmente, la desviación estándar de los grupos de tratamiento de los genes CA (Tabla 15 y/o Figura 13A) y CaBP (Tabla 15 y/o Figura 13B) es muy grande, por lo que basándose en este valor los resultados de concordancia entre qPCR y RNAseq y de significancia en el cambio de su nivel de expresión podrían considerarse inconclusos y poco claros.

**Tabla 15. Tabla resumen de los promedios y desviaciones estándar de los fold change obtenidos en qPCR de cada gen de *Drepanocladus longifolius*.**

Gen	Promedio FC	SD FC	t-statistic	df	VALOR P	Significancia
CA	39,27	56,89	-1,17	2	0,18	No significativo
CaBP	0,79	0,67	0,55	2	0,32	No significativo
CAT	0,06	0,04	36,52	2	< 0,05	significativo
GST	0,05	0,03	54,02	2	< 0,05	significativo

<b>ME</b>	3,54	1,28	-3,5	2	<0,05	significativo
<b>TIF</b>	0,57	0,43	1,7	2	0,12	No significativo



**Figura 13. Gráficos de expresión relativa para validación del RNaseq.** Control, Tratamiento y RNaseq para los genes CA (A) CaBP (B), CAT(C) y GST(D) ME (E) y TIF (F). La barra roja con asterisco indica diferencia significativa entre control y tratamiento según test de yuen (valor  $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

### Estrés por temperatura

En el RNAseq de *D. longifolius* obtuvimos 560 genes que se sobreexpresaban y 662 que se inhibían. Dentro de los genes más inhibidos en la tabla 4, hay un gen que codifica para una proteína de la familia Hsp 70; HSP70-9 ( $\log(2)$  fold change = -7,43), cuya función en otros organismos fotoautótrofos, se sabe está directamente relacionada con la respuesta de estrés por temperatura, presentando sobreexpresión cuando los organismos son expuestos a este tipo de estrés abiótico (Saidi *et al.*, 2009; Saidi *et al.*, 2010; Finka *et al.*, 2012; Celis-Pla *et al.*, 2020), por lo tanto, la inhibición de esta chaperona no parece algo lógico a primera vista. Sin embargo, según un estudio de Tronconi *et al.*, 2008 en *Arabidopsis thaliana*, la inhibición de la enzima malica (ME) puede alterar los niveles del estado estacionario de los azúcares y aminoácidos al final de la fase lumínica. Esto último es consistente con la evidencia señalada por Diamant *et al.*, 2001, donde se sugiere que la acumulación de azúcares y osmolitos pueden ser beneficiosos en condiciones de estrés por temperatura y actuar directamente o ayudando HSPs. Esta inhibición puede ser un reflejo de que la enzima ME esté sustituyendo las funciones de la proteína Hsp70, además dentro de los genes sobreexpresados codificantes para proteínas transportadoras encontramos SWEET7B; correspondiente a un transportador bidireccional de azúcar.

Dentro de las categorías de genes más sobreexpresadas tenemos CTE, y dentro de los genes con mayores valores de  $\log(2)$  fold change encontramos 5 genes de la misma categoría, dentro de los cuales tenemos 22 genes codificantes para proteínas pertenecientes a la familia de citocromo p450 tales como CYP707A1, CYP709B2, lo cual es consistente con lo planteado por Kumar *et al.*, 2015 quien encontró sobreexpresión citocromo p450 en plantas de trigo expuestas a estrés por temperatura. Dentro de los genes con mayor valor de fold change, hubo dos codificando para el cotransportador de sodio DUR3.

La inhibición de GSTL2, es consistente con lo encontrado por Zhang *et al.*, 2020, que reportaron inhibición en 4 genes codificantes para GST en plantas de *Solanum melanogena* bajo estrés por aumento de temperatura.

En la validación de RNAseq por qPCR nos encontramos que existía una inhibición significativa de GST y CAT entre el grupo control y experimental, y una sobreexpresión significativa para ME lo cual se condecía con el RNAseq. CAT y GST son moléculas involucradas en el metabolismo de estrés oxidativo. Sin embargo, TIF mostró inhibición en qPCR y sobreexpresión en RNAseq. Este resultado representa que un 16% de la validación con qPCR no se condice con el RNAseq. Lo anterior se puede explicar en base a un estudio de Everaert *et al.*, 2017, quienes determinaron que la mayoría de los genes no concordantes entre qPCR y RNAseq en experimentos de validación suelen tener bajos niveles de expresión diferencial, pequeños y con pocos exones. Por lo general, los genes no concordantes representan entre un 15-20% (Everaert *et al.*, 2017; Coenye, T., 2021). Sin embargo, existen genes no concordantes con diferencias sustanciales en sus niveles de expresión diferencial entre RNAseq y qPCR, los cuales representan un 1,8% del total de genes secuenciados en un RNAseq (Everaert *et al.*, 2017).

Finalmente, podemos observar que la actividad metabólica, fotosintética y de respiración de *D. longifolius* es activada en respuesta a un aumento en la temperatura, la sobreexpresión de genes asociados a proteínas transportadoras, mitocondriales y cloroplásticos sumado a la baja representatividad de HSPs y genes relacionados con el estrés abiótico dentro del grupo cuyo nivel de expresión diferencial indica una sobreexpresión, sumado a la inhibición de los genes codificantes para las HSPs: HSC-2, PTI12, MED37E (codificada por 2 genes), ATJ20, HSP17.9, y HSC-2, para los factores de transcripción de HSPs; HSF2E, HSFA1 y codificantes para proteínas relacionados a la respuesta a bajas temperaturas, senescencia y deshidratación; ERD7, At3g51250 y P85 (codificado por 3 genes) son señal de que el organismo tolera un aumento de 6 °C en la temperatura. Sin embargo, es necesario profundizar más en este tema y preguntarse tal vez por cuanto tiempo es capaz el organismo de responder bien a las altas temperaturas, o bajo que temperaturas podrían comenzar a activarse las

respuestas clásicas de estrés abiótico por aumento la temperatura. Mas aún la inhibición del ultimo grupo de genes relacionados a la respuesta a bajas temperaturas, podría ser señal de que el organismo se encuentra constantemente combatiendo las bajas temperaturas del ambiente en el que se encuentra naturalmente, lo que tiene sentido si tomamos en cuenta la hipótesis de recolonización post glacial desde el cono sur a la Antártica planteada por Saluga *et al.*, 2018.

### **Estrés por salinidad**

En figuras 5 y 8 tenemos la información resumida de la cantidad de genes que se sobreexpresan, se inhiben y permanecen sin cambio para *Cymodocea nodosa* y *Posidonia oceanica* respectivamente. La tendencia de ambas especies fue en primer lugar que una gran cantidad de genes permaneció sin cambios significativos en su nivel de expresión y en segundo lugar que la cantidad de genes inhibidos fue mayor a la cantidad de genes sobreexpresados, siendo esta diferencia más marcada en *P. oceanica* donde se observó que hubo una sobreexpresión de 89 genes y una inhibición de 330. Esta tendencia a una mayor inhibición en la expresión de genes de *C. nodosa* es consistente con los resultados obtenidos por Piro *et al.*, 2015, donde se reporta un decrecimiento del 20-30% en la cantidad de proteínas de las plantas expuestas a estrés salino. En general se entiende que cuando la inhibición es mayor que la sobreexpresión, es porque el organismo no es capaz de responder adecuadamente al estrés abiótico, es decir, en este caso no hubo mecanismos que le permitieron a los pastos marinos adaptarse al aumento en la salinidad. Lo anterior es consistente con los hallazgos de Carpaneto *et al.*, 2004; Sánchez-Lizaso *et al.*, 2008; Sandoval-Gil *et al.*, 2012, quienes concluyen que estas especies de fanerógamas marinas no son tolerantes a los aumentos de salinidad y particularmente en el caso de *P. oceanica* existe evidencia que a salinidades mayores de 39,5 PSU existe una perdida de vitalidad del organismo.

En *C. nodosa* se observó una alta sobreexpresión de quinasas, sin embargo, los valores de log(2) fold change nos son tan elevados como los que encontramos en

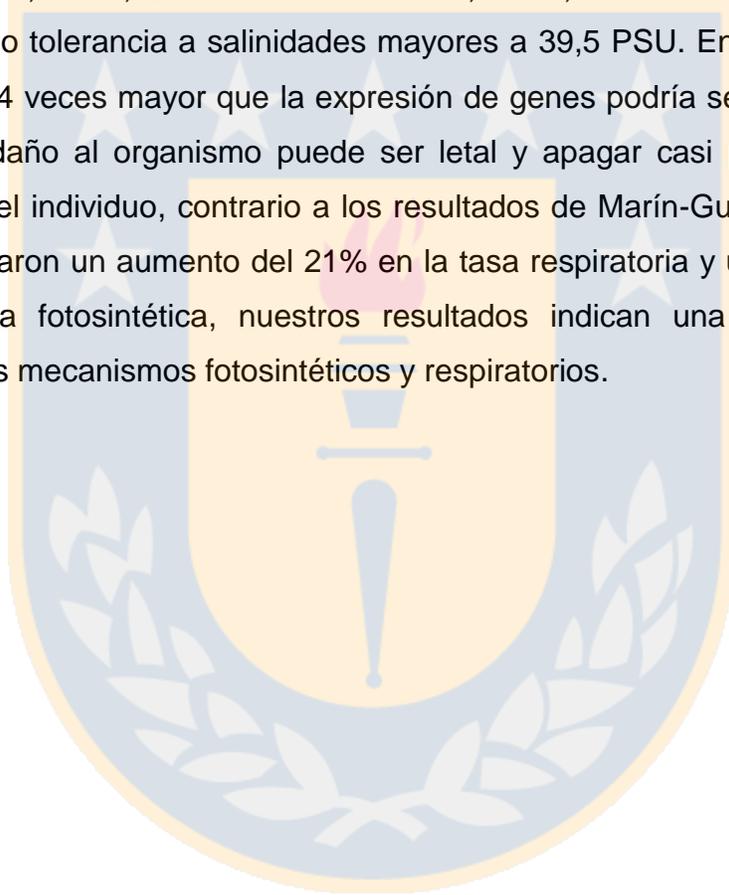
los genes dentro de las categorías metabolismo de lípidos y de transporte. Piro *et al.*, 2015 y Tsioli *et al.*, 2022, quienes encontraron que al aumentar la salinidad aumenta el tamaño de las vacuolas, por ende la capacidad de acumular osmolitos aumenta, pero se reduce el potencial hídrico. Dicho mecanismo puede ser logrado a través de la biosíntesis de lípidos y el aumento en el transporte de solutos. Además, dentro de la categoría estrés se observó una alta representatividad de genes codificantes para proteínas con motivo pentatricopeptido repetido, el cual está relacionado con la biogénesis de organelos y la protección del genoma de los organelos (Manna, S. 2015). La inhibición en los genes relacionados con cadenas de transporte de electrones también es consistente con lo hallado por Piro *et al.*, 2015, donde encontraron una reducción significativa de RuBisCo y LHCP.

En *P. oceanica* hubo un aumento en la expresión de genes relacionados con el transporte y el estrés sumados a un ligero aumento del metabolismo de azúcares respaldan los hallazgos de Marín-Guirao *et al.*, 2011; Sandoval-Gil *et al.*, 2012 que sugieren que las plantas de *P. oceanica* expuestas a hipersalinidad pudieron lograr una osmorregulación mediante la acumulación de osmolitos orgánicos en el tejido de las hojas lo que se tradujo en un alto consumo energético y recursos que finalmente en un tratamiento prolongado de aumento de salinidad llevo a la necrosis de dichos tejidos debido a la inhibición de la capacidad fotosintética y respiratorias de las células. Lo anterior se condice con lo observado en la categoría CTE representada por 50 genes inhibidos y 12 sobreexpresados. Dentro de los inhibidos encontramos el gen mitocondrial AOX1A; ubiquinol oxidasa 1a y los genes cloroplásticos LHCSR1; proteína relacionada con estrés del complejo antena, MT-CO3; subunidad 3 de citocromo c oxidasa que además están dentro de los genes con mayor inhibición basándonos en su valor de log (2) fold change (-9,95, -8,5, -8,1 respectivamente). Acorde a lo observado, Lv *et al.*, 2018 reportaron en *Z. marina* una inhibición significativa de ubiquinol citocromo c reductasa y proteínas de unión entre clorofila a/b y LHCI/II en tratamiento con aumento en la salinidad.

Sobre la base de lo observado podemos establecer que existen diferencias sustanciales entre ambas especies de fanerógamas marinas. *Cymodocea nodosa* refleja una activación de la señalización celular a través de la sobreexpresión de

genes codificantes para proteínas quinasas, probablemente los genes relacionados con estrés, CTE y transporte estén asociados a estas vías. Sin embargo, a pesar de responder al estrés, la alta inhibición de genes en la categoría CTE indican que la respuesta no está permitiendo un funcionamiento adecuado de la fotosíntesis y respiración.

En *P. oceanica*, la alta cantidad de genes inhibidos sumado a la alta representatividad de genes en la categoría CTE respalda los hallazgos de Carpaneto *et al.*, 2004; Sánchez-Lizaso *et al.*, 2008; Sandoval-Gil *et al.*, 2012 respecto a la no tolerancia a salinidades mayores a 39,5 PSU. En este caso, una inhibición casi 4 veces mayor que la expresión de genes podría ser reflejo de que a 43 PSU el daño al organismo puede ser letal y apagar casi por completo el metabolismo del individuo, contrario a los resultados de Marín-Guirao *et al.*, 2013 quienes registraron un aumento del 21% en la tasa respiratoria y una disminución del 29% en la fotosintética, nuestros resultados indican una inhibición casi completa de los mecanismos fotosintéticos y respiratorios.



## BIBLIOGRAFÍA

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399.

Aranda P., D. LaJoi e. & C. Jorcyk. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33: 366-369.

Bevilacqua. S., S. Katsanevakis., F. Micheli., E. Sala., G. Rilov., G. Sarà., D.A. Malak., A. Abdulla., V. Gerovasileiou., V. Stelzemüller., A. Terlizzi., V. Todorova & S. Fraschetti. 2020. The Status of Coastal Benthic Ecosystems in the Mediterranean Sea: Evidence from Ecological Indicators. *Frontiers in Marine Science*, 7:(475)1-8.

Boretti. A & L. Rosa. 2019. Reassessing the projections of the world water development report. *Npj Clean water*, 2: 15.

Boudouresque. C., B. Guillaume., P. Gerard., S. Abdessalem & V. Marc. 2009. Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: A critical review. *Botanica Marina*. 52:395-418.

Carpaneto, A., A. Naso., A. Paganetto., L. Cornara., E-R. Pesce & F. Gambale. 2004. Properties of ion channels in the protoplasts of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant, Cell and Environment*, 27: 279–292.

Celis-Plá, P. S. M., Moenne, F., Rodríguez-Rojas, F., Pardo, D., Lavergne, C., Moenne, A., Brown, M. T., Huovinen, P., Gómez, I., Navarro, N., & Sáez, C. A. (2020). Antarctic intertidal macroalgae under predicted increased temperatures mediated by global climate change: Would they cope? *The Science of the Total Environment*, 740, 140379.

Coenye, T. (2021). Do results obtained with RNA-sequencing require independent verification? *Biofilm*, 3(100043), 100043.

Denman S.E. & C.S. McSweeney. 2005. Quantitative (real-time) PCR. Makkar H.P & McSweeney C.S. (eds) *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Springer, Dordrecht. 225pp.

del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330–335.

Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., & Goloubinoff, P. (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39586–39591.

Elzanati, O., Mouzeyar, S., & Roche, J. (2020). Dynamics of the Transcriptome Response to Heat in the Moss, *Physcomitrella patens*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1512.

Everaert, C., Luybaert, M., Maag, J. L. V., Cheng, Q. X., Dinger, M. E., Hellemans, J., & Mestdagh, P. (2017). Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Scientific Reports*, 7(1), 1559.

Fernández-Torquemada, Y & J.L, Sánchez-Lizaso. 2005. Effects of salinity on leaf growth and survival of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Experimental Marine Biology*, 320: 57-63.

Fernandez-Torquemada, Y., J. M. Gonzalez-Correa., A. Loya, L., M. Ferrero., M. Diaz-Valdes & J. L. Sanchez-Lizaso. 2009. Dispersion of brine

discharge from seawater reverse osmosis desalination plants. *Desalination and Water Treatment*, 5:137-145.

Finka, A., Cuendet, A. F. H., Maathuis, F. J. M., Saidi, Y., & Goloubinoff, P. (2012). Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *The Plant Cell*, 24(8), 3333–3348.

Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866–1875.

Garrote-Moreno. A., J. M. Sandoval-Gil., J. M. Ruiz., L. Marín-Guirao., J. Bernardeau-Esteller., R. García & J.L Sánchez-Lizaso. 2015. Plant water relations and ion homeostasis of Mediterranean seagrasses (*Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*) in response to hypersaline stress. *Marine Biology*, 162: 55-68.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.

Gill, S. S., Khan, N. A., Anjum, N. A., & Tuteja, N. (2011). Amelioration of Cadmium stress in crop plants by nutrient management: Morphological, physiological and biochemical aspects. *Plant stress*. Global Science Books. 5(1): 1-23.

Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology: FPB*, 32(6), 481–494.

Guillén. J.E., J. L. Sánchez-Lizaso., S. Jiménez., J. Martínez., A. Codina., M. Montero., A. Triviño., G. Soler & J. J. Zubcoff. 2013. Evolution of *Posidonia oceanica* seagrass meadows and its implications for management. *Journal of Sea Research*, 83: 65-71.

Hardlickova, R., Toloue, M., & Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 8(1).

Hématy, K., & Höfte, H. (2008). Novel receptor kinases involved in growth regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 321–328.

Ikeda, M., Mitsuda, N., & Ohme-Takagi, M. (2011). Arabidopsis HsfB1 and HsfB2b act as repressors of the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance. *Plant Physiology*, 157(3), 1243–1254.

IPCC, 2018: Resumen para responsables de políticas. En: Calentamiento global de 1,5 °C, Informe especial del IPCC sobre los impactos del calentamiento global de 1,5 °C con respecto a los niveles preindustriales y las trayectorias correspondientes que deberían seguir las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero, en el contexto del reforzamiento de la respuesta mundial a la amenaza del cambio climático, el desarrollo sostenible y los esfuerzos por erradicar la pobreza [Masson-Delmotte V., P. Zhai, H.O. Partner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. P.an, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor & T. Waterfield (eds.)].

Jones. E., Q. Manzoor., T.H.M. van Vliet., V. Smakhitin & S. Kang. 2018. The state of desalination and brine production: A global outlook. *Science of the total environment*, 657: 1343-1356.

Kong F., H. Li., P. Sun., Y. Zhou & Y. Mao. 2014. De Novo Assembly and Characterization of the Transcriptome of Seagrass *Zostera marina* Using Illumina Paired-End Sequencing. *plos one*. 9:11.

Kumar, R. R., Goswami, S., Sharma, S. K., Kala, Y. K., Rai, G. K., Mishra, D. C., Grover, M., Singh, G. P., Pathak, H., Rai, A., Chinnusamy, V., & Rai, R. D. (2015). Harnessing next generation sequencing in climate change: RNA-seq analysis of heat stress-responsive genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 19(10), 632–647.

Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, (25)4:402–408.

Longton, R.E. 1997. The role of bryophytes and lichens in polar ecosystems. In *Ecology of Arctic environments: 13th special symposium of the British Ecological Society* (eds Woodin SJ & Marquiss M), p. 294. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Lv, X., Yu, P., Deng, W., & Li, Y. (2018). Transcriptomic analysis reveals the molecular adaptation to NaCl stress in *Zostera marina* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 61–68.

Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139–158.

Malandrakis, E., Dadali, O., Kavouras, M., Danis, T., Panagiotaki, P., Miliou, H., Tsioli, S., Orfanidis, S., Küpper, F. C., & Exadactylos, A. (2017). Identification of the abiotic stress-related transcription in little Neptune grass *Cymodocea nodosa* with RNA-seq. *Marine Genomics*, 34, 47–56.

Manna, S. (2015). An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie*, 113, 93–99.

Manea. E., S. Bianchelli., E. Fanelli., R. Danovaro & E. Gissi. 2020. Towards an Ecosystem-Based Marine Spatial Planning in the deep Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment*, 715: 1-15.

Marín-Guirao, L., Sandoval-Gil, J. M., Ruíz, J. M., & Sánchez-Lizaso, J. L. (2011). Photosynthesis, growth and survival of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* in response to simulated salinity increases in a laboratory mesocosm system. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(2), 286–296.

Marín-Guirao, L., Sandoval-Gil, J. M., Bernardeau-Esteller, J., Ruíz, J. M., & Sánchez-Lizaso, J. L. (2013). Responses of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* to hypersaline stress duration and recovery. *Marine Environmental Research*, 84, 60–75.

Mathur. S., D. Agrawal & A. Jajoo. 2014. Photosynthesis: Limitations in Response to High Temperature Stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137:116-126.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498.

Mullis. K., F. Faloona., S. Scharf., R. Saiki., G. Horn & H. Erlich. 1998. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.

Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., & Jacquot, J.-P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 129(1), 185–195.

Nibau, C., & Cheung, A. Y. (2011). New insights into the functional roles of CrRLKs in the control of plant cell growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 6(5), 655–659.

Piro, A., Marín-Guirao, L., Serra, I. A., Spadafora, A., Sandoval-Gil, J. M., Bernardeau-Esteller, J., Fernandez, J. M. R., & Mazzuca, S. (2015). The modulation of leaf metabolism plays a role in salt tolerance of *Cymodocea nodosa* exposed to hypersaline stress in mesocosms. *Frontiers in Plant Science*, 6, 464.

Pisano, A., S. Marullo., V. Artale., F. Falcini., C. Yang., F.E. Leonelli., R. Santoleri & B.B. Nardelli. 2020. New Evidence of Mediterranean Climate Change and Variability from Sea Surface Temperature Observations. *Remote Sensing*. 12: (132)1-18.

Prather, H. M., A. Casanova-Katny., A.F. Clements., M.W. Chmielewski., M.A. Balkan., E.E. Shortlidge., T.N. Rosenstiel & S.M. Eppley. 2019. Species-specific effects of passive warming in an Antarctic moss system. *Open science*, 6: 190744.

Rubio. L., D. García-Pérez., M.J. García-Sánchez & J.A. Fernández. 2018. Na<sup>+</sup>-Dependent High-Affinity Nitrate, Phosphate and Amino Acids Transport in Leaf Cells of the Seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6):1-13.

Ruibal, C., Castro, A., Carballo, V., Szabados, L., & Vidal, S. (2013). Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4. *BMC Plant Biology*, 13(1), 174.

Sáez C., K. Ramesh., M. Greco., M.B. Bitonti & M.T. Brown. 2015. Enzymatic antioxidant defences are transcriptionally regulated in Es524, a copper tolerant strain on *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Phycologia*, 54(4): 425-429.

Saidi. Y., A. Finka., M. Muriset., Z. Bromberg., Y.G. Weiss., F.J.M. Maathuis & P. Goloubinoff. 2009. The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane. *The Plant Cell*, 9: 2829–2843.

Saidi, Y., Peter, M., Finka, A., Cicekli, C., Vigh, L., & Goloubinoff, P. (2010). Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca<sup>2+</sup>-dependent heat shock response. *Plant Signaling & Behavior*, 5(12), 1530–1533.

Saługa. M., R. Ochyra., J. Zarnowiec & Ronickier. M. 2018. Do Antarctic populations represent local or widespread phylogenetic and ecological lineages? Complicated fate of bipolar moss concepts with *Drepanocladus longifolius* as a case study. *Organism Diversity and Evolution*, 18: 263–278.

Sánchez-Lizaso, J. L., Romero, J., Ruiz, J., Gacia, E., Buceta, J. L., Invers, O., Fernández Torquemada, Y., Mas, J., Ruiz-Mateo, A., & Manzanera, M. (2008). Salinity tolerance of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: recommendations to minimize the impact of brine discharges from desalination plants. *Desalination*, 221(1–3), 602–607.

Sandoval-Gil J.M., L. Marín-Guirao & J.M. Ruiz. 2012. Tolerance of Mediterranean seagrasses (*Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*) to hypersaline stress: water relations and osmolyte concentrations. *Marine Biology*, 159: 1129-1141.

Sharkey T.D & S.M. Schrader. 2006. High Temperature Stress. In: Madhava Rao K., Raghavendra A., Janardhan Reddy K. (eds) Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, Chapter 4, 101-129.

Soudzilovskaia N.A., P.M. van Bodegom & J.H.C. Cornelissen., 2013. Dominant bryophyte control over high-latitude soil temperature fluctuations predicted by heat transfer traits, field moisture regime and laws of thermal insulation. *Functional Ecology*. 27: 1442-1454.

Touchette, B.W. 2007. Seagrass-salinity interactions: Physiological mechanisms used by submersed marine angiosperms for a life at sea. *Experimental Marine Biology*, 350: 194-215.

Tronconi, M. A., Fahnenstich, H., Gerrard Weehler, M. C., Andreo, C. S., Flügge, U.-I., Drincovich, M. F., & Maurino, V. G. (2008). Arabidopsis NAD-malic enzyme functions as a homodimer and heterodimer and has a major impact on nocturnal metabolism. *Plant Physiology*, 146(4), 1540–1552.

Tsioli, S., Koutalianou, M., Gkafas, G. A., Exadactylos, A., Papathanasiou, V., Katsaros, C. I., Orfanidis, S., & Küpper, F. C. (2022). Responses of the Mediterranean seagrass *Cymodocea nodosa* to combined temperature and salinity stress at the ionic, transcriptomic, ultrastructural and photosynthetic levels. *Marine Environmental Research*, 175(105512), 105512.

Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology*, 428, 419–438.

UNEP(DEPI)/MED. 2017. Updated guidelines on the management of desalination activities. IG23/23, 667-703.

Younesi-Melerdi, E., Nematzadeh, G.-A., Pakdin-Parizi, A., Bakhtiarizadeh, M. R., & Motahari, S. A. (2020). De novo RNA sequencing analysis of *Aeluropus littoralis* halophyte plant under salinity stress. *Scientific Reports*, 10(1), 9148.

Zhang, A., Zhu, Z., Shang, J., Zhang, S., Shen, H., Wu, X., & Zha, D. (2020). Transcriptome profiling and gene expression analyses of eggplant (*Solanum melongena* L.) under heat stress. *PloS One*, 15(8).

