



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

ESCUELA DE BIOLOGÍA

“ANÁLISIS DEL DESARROLLO DE LA BRIOFITA  
MEXICANA TOLERANTE A LA DESECACIÓN  
*PSEUDOCROSSIDIUM REPLICATUM* EN RESPUESTA A  
SEÑALES DE AZÚCARES EN CONDICIONES DE  
CULTIVO IN VITRO”

Tesis que para obtener el título de  
Bióloga

PRESENTA:

Erika Alejandra Hernández Sanabria

TUTORA: Dra. Analilia Arroyo Becerra

Puebla de Zaragoza, Diciembre 2014



## INDICE

RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	6
MARCO TEORICO.....	7
Importancia de los azúcares para las plantas.....	7
Sistema de percepción de azúcares en plantas superiores .....	8
Las Hexocinasas como sensores de la Glc .....	8
Otros sensores de Glc (independientes de HXK) .....	10
Intercomunicación de vías de señalización de Glc con vías hormonales en las plantas	11
Generalidades de Briofitas .....	12
Anatomía y ciclo de vida de los musgos.....	13
Morfología de los musgos .....	13
Ciclo de vida de los musgos.....	14
Papel de las fitohormonas en el desarrollo de musgos.....	15
Tolerancia a estrés abiótico en briofitas .....	17
ANTECEDENTES .....	19
Antecedentes del sistema biológico de estudio .....	19
Antecedentes acerca del papel de la Glc en el desarrollo de los musgos.....	20
JUSTIFICACIÓN .....	22
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVOS .....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos particulares.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
Estrategia Experimental .....	25
Material biológico .....	26
Condiciones de crecimiento .....	27
Propagación del material vegetal .....	27
Elaboración y mantenimiento de “stocks” de tejido protonemal .....	28
Siembra de tejido protonemal en membranas de celofán.....	29
Tratamientos en Glc y Stl en <i>P. replicatum</i> .....	30
Tratamientos con fitohormonas en el musgo modelo <i>P. patens</i> .....	30

Tratamientos para determinación de interacción de vías de Glc/Man-fitohormonas .....	33
Análisis fenotípico .....	33
Determinación del crecimiento expansivo (CE) .....	34
Conteo de Gametóforos .....	34
Determinación de eficiencia fotosintética (EF) en tratamientos de Glc y Stl .....	35
Analisis estadístico.....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
Efecto de la Glc en protonemas de <i>P. replicatum</i> .....	35
.....	40
.....	40
Efecto de la Glc a concentraciones bajas sobre la EF .....	40
Efecto de la Glc a concentraciones altas sobre la EF .....	41
Efecto de la Glc a concentraciones muy altas sobre la EF .....	42
Evaluación de las vías de señalización de Glc dependientes de HXK (Man) e independientes de metabolismo en el fenotipo de <i>P. replicatum</i> .....	43
Evaluación del efecto de la Glc o su análogo (Man) dependiente de HXK, en presencia de fitohormonas, en el desarrollo de <i>P. patens</i> .....	45
Evaluación del efecto de la Glc o su análogo (Man) dependiente de HXK, en presencia de ABA, en el desarrollo de <i>P. replicatum</i> .....	55
Efecto de la Glc en el desarrollo de gametóforos en protonemas de <i>P. replicatum</i> .....	57
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>58</b>
Efecto de la Glc a diferentes concentraciones en protonemas de <i>P. replicatum</i> .....	58
Efecto de la Glc a diferentes concentraciones sobre la EF de <i>P. replicatum</i> .....	60
.....	61
Efecto de la Glc y su análogo dependiente de HXK e independiente de metabolismo (Man) en el fenotipo de <i>P. replicatum</i> .....	61
Efecto de la Glc o su análogo (Man) dependiente de HXK, en presencia de ABA, en el desarrollo de <i>P. replicatum</i> .....	63
Efecto de la Glc o su análogo (Man) dependiente de HXK, en presencia de fitohormonas, en el desarrollo de <i>P. patens</i> .....	65
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>70</b>
Particulares .....	71
Objetivo No. 1 .....	71
Objetivo No. 2 .....	71
Objetivo No. 3 .....	71

Objetivo No. 4 .....	71
Generales .....	72
PERSPECTIVAS .....	73
BIBLIOGRAFÍA .....	74
REFERENCIAS PAGINAS WEB.....	78
ANEXOS .....	79

## RESUMEN

La Glucosa (Glc) es una molécula de gran importancia en el metabolismo y desarrollo de los seres vivos y en particular de las plantas. Anteriormente se creía que los azúcares tenían un rol únicamente como parte de las vías metabólicas; sin embargo, recientemente se sabe que los azúcares también actúan como molécula de señalización regulando procesos de desarrollo, fisiológicos y de expresión génica. La investigación acerca de las respuestas de las plantas a la presencia de los azúcares exógenos se ha realizado esencialmente en plantas vasculares como *Arabidopsis thaliana*, por lo que el estudio se hace difícil ya que las respuestas a la Glc varían dependiendo de la etapa del desarrollo y la complejidad morfológica de la planta. Recientemente, el estudio de los azúcares como molécula de señalización se ha abierto camino en plantas no vasculares como son los musgos, los cuales son un modelo experimental exquisito, por sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas.

En este trabajo se determinó el efecto de la Glc como de molécula señal mediante el análisis fenotípico y fisiológico del musgo tolerante a la desecación *Pseudocrossidium replicatum* sometido a diferentes concentraciones de Glc exógena. Así mismo, se determinó si las respuestas a la Glc en dicha planta son dependientes o independientes de hexocinasa (HXK) y de metabolismo utilizando un análogo fosforilable por la HXK pero no metabolizable (Manosa). Además, se determinó la posible interacción de vías de señalización hormonales con la vía activada por Glc, realizando como primer abordaje ensayos en el musgo modelo *Physcomitrella patens* para determinar el efecto de 4 fitohormonas en el desarrollo del musgo y la interacción de las vías de señalización de dichas fitohormonas con las vías de señalización activadas por Glc. Los resultados obtenidos en estos experimentos nos ayudaron a seleccionar la hormona a utilizar en experimentos relacionados con la evaluación de interacción de las vías de señalización hormonal y de azúcares en *P. replicatum*.

Los resultados indican que las concentraciones bajas de Glc (100 mM) tienen un efecto negativo en el crecimiento expansivo (CE) y la pigmentación de *P. replicatum*. De igual forma, concentraciones altas de Glc (300 y 500 mM) tienen un efecto negativo en la pigmentación del musgo así como en el CE. Concentraciones de 300 mM reducen la tasa fotosintética de *P. replicatum* mientras que el efecto de Glc 500 mM no fue diferenciable del efecto osmótico.

Los tejidos protonemales de *P. replicatum* sometidos a concentraciones muy altas de Glc y Stl (700 y 1000 mM) presentaron disminución en el CE así como fenotipos de crecimiento severamente arrestado, obscurecimiento de tejido en Glc 700 mM y fenotipos cloróticos/albinos en 1000 mM atribuibles al efecto osmótico causado por concentraciones altas de este azúcar. Cabe señalar que Glc 700 mM asevera la disminución en el CE del musgo *P. replicatum*.

Al realizar el análisis fenotípico para determinar la participación de las vías de señalización de Glc dependientes de HXK e independientes de metabolismo en *P. replicatum*, se concluyó que la Glc (30 mM) reduce la pigmentación y el crecimiento del musgo a través de una vía dependiente de HXK y de metabolismo.

Para los bioensayos de interacción de vías de señalización Glc-fitohormonas en *P. patens* se utilizaron las fitohormonas Acido abscísico (ABA), Bencil amino purina (BAP) y ácido indolacético (IAA). Los resultados evidenciaron que existe intercomunicación entre la vía de señalización de Glc con ABA, BAP e IAA por vías dependientes de HXK e independientes del metabolismo.

Con base en los resultados obtenidos en el musgo modelo *P. patens* se seleccionó la hormona ABA para analizar la interacción de las vías de señalización activadas por Glc – fitohormonas en *P. replicatum*. Se evidenció una intercomunicación entre la señalización de Glc y ABA en las condiciones probadas. La vía de señalización activada es dependiente de HXK e independiente de metabolismo.

Por lo tanto, en este trabajo se evidenció que la Glc modula el desarrollo y la fotosíntesis de *P. replicatum* y que la intercomunicación de vías de respuesta a Glc y

fitohormonales está conservada en dos briofitas con características diferentes de tolerancia a desecación, (*P. replicatum* tolerante y *P. patens* no tolerante).

Así mismo, los resultados de este trabajo indican que tanto en plantas vasculares como en no vasculares existen vías de señalización de respuesta a Glc dependientes de HXK así como vías dependientes e independientes de su metabolismo subsecuente que interactúan con vías hormonales, lo que indica que dichas vías surgieron muy temprano en la evolución de las plantas terrestres.

## INTRODUCCIÓN

Las concentraciones de azúcares juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los azúcares actúan como reguladores de su crecimiento y desarrollo, regulando la germinación, el desarrollo de la semilla (Gupta y Kaur, 2005), el desarrollo de las plántulas, la formación de la hoja y la raíz, la floración, la embriogénesis, e incluso la senescencia (Rosa *et al.*, 2009).

La principal planta vascular modelo para el estudio de las vías de señalización de los azúcares ha sido *A. thaliana* (Jang *et al.*, 1997). Sin embargo, recientemente los musgos han despertado interés para ser utilizados como modelo de estudio ya que poseen características genéticas y biológicas que los hacen factibles como modelo experimental (Cove *et al.*, 2006). El estudio de los azúcares como molécula señal es un tema complejo, ya que se sabe que las vías de señalización de los azúcares como es el caso de la Glc, se interconectan con otras vías, como la de las hormonas vegetales, aunado al hecho de que las respuestas de la Glc en plantas vasculares dependen del tipo de tejido y de los tipos celulares a lo largo de las diferentes estructuras de la planta (Rolland *et al.*, 2006).

En este trabajo evaluamos el efecto de la Glc como molécula señal mediante el análisis fenotípico y fisiológico del musgo tolerante a la desecación *P. replicatum* sometido a diferentes concentraciones de Glc exógena. Así mismo, se determinó si las respuestas a la Glc en dicha planta son dependientes o independientes de hexocinasa (HXK); así como de metabolismo, utilizando un análogo fosforilable por la HXK pero no

metabolizable (Manosa). Además, se determinó la posible interacción de vías de señalización hormonales con la vía activada por Glc en dos briofitas, *P. replicatum* (tolerante a desecación) y *P. patens* (no tolerante). Esto es fundamental para saber si las vías de señalización así como la interconexión de las vías de señalización de la Glc y hormonas vegetales se conservan en plantas no vasculares, tal como ocurre en plantas vasculares.

## MARCO TEORICO

### Importancia de los azúcares para las plantas

Los azúcares son moléculas fundamentales para la vida en la tierra (Hanson y Smeekens, 2009). En las plantas, los azúcares son producidos durante el proceso de la fotosíntesis, constituyen los sustratos del metabolismo del carbono y son también una fuente universal de energía (Gupta y Kaur, 2005). Anteriormente se creía que en plantas superiores los azúcares tenían un rol únicamente como parte de las vías metabólicas; sin embargo, recientemente se sabe que los azúcares también actúan como molécula de señalización (Hanson y Smeekens, 2009). Así mismo, se sabe que no todos los carbohidratos tienen la capacidad de actuar como molécula de señalización, ésta capacidad se le atribuye únicamente a los azúcares solubles, principalmente la sacarosa (Sac) y a las hexosas como la glucosa (Glc) y la fructosa (Frc) (Rosa *et al.*, 2009).

En plantas superiores, los altos niveles de azúcar causan retraso en el crecimiento, reducción de la tasa fotosintética, acumulación de antocianinas, y hojas cloróticas y necróticas (Caspari *et al.*, 1994). Las concentraciones altas de azúcares solubles como Sac y Glc retardan la germinación de semillas de haba, ya que disminuyen la diferenciación celular del embrión y por ende retardan la germinación (Weber *et al.*, 1997). Por otro lado, en *A. thaliana* bajas concentraciones de azúcares durante el proceso post-germinativo promueven el desarrollo de ésta. En contraste, la ausencia de azúcares minimiza el desarrollo de la planta; sin embargo, en presencia de concentraciones muy altas de azúcares se reprime la movilización de nutrientes, el

crecimiento del hipocótilo, el enverdecimiento y la expansión de los cotiledones, lo que provoca la interrupción del desarrollo temprano de la planta (Jang *et al.*, 1997).

Los azúcares están presentes en las diferentes etapas de desarrollo de las plantas; desde la germinación, el desarrollo de la semilla (Gupta y Kaur, 2005), el desarrollo de las plántulas, la formación de la hoja y la raíz, la floración, la embriogénesis, e incluso la senescencia (Rosa *et al.*, 2009). La Glc y la Sac están implicadas en el proceso de la fotosíntesis, modulando la actividad transcripcional de promotores de genes fotosintéticos (Koch *et al.*, 1992), altos niveles de azúcares reducen la asimilación de carbono durante la fotosíntesis, por el contrario bajas cantidades de azúcares dan como resultado un incremento en la capacidad fotosintética (Koch, 1996; Ramon *et al.*, 2008).

## Sistema de percepción de azúcares en plantas superiores

### Las Hexocinasas como sensores de la Glc

Descubrimientos recientes han demostrado que solo dos familias de enzimas son capaces de fosforilar la Glc y la Frc (Hexosas). En plantas, la Glc es fosforilada sólo por HXK mientras que la Frc es fosforilada tanto por HXKs como por fructocinasas (FXKs) (Rolland *et al.*, 2006). Se sabe que algunas HXKs poseen una doble función, actuando como enzimas que a la vez funcionan como sensores de los niveles de azúcares (Granot *et al.*, 2013). Las HXKs son los más antiguos sensores de azúcar (Rolland *et al.*, 2001).

En la actualidad se han sugerido al menos tres vías de señalización de la Glc, dos de las cuales involucran a las HXKs (Xiao *et al.*, 2000):

- ✓ Dependiente de HXK pero independiente de metabolismo
- ✓ Dependiente de HXK pero dependiente de metabolismo
- ✓ Ruta independiente de HXK

Los efectos del azúcar en el crecimiento y desarrollo de las plantas a menudo se atribuyen al metabolismo del azúcar (vía dependiente de HXK y dependiente de metabolismo), también llamada vía de la glucólisis (Xiao *et al.*, 2000). Pero existen evidencias de la existencia de otras dos vías. Las evidencias acerca de la vía

dependiente de HXK e independiente de metabolismo han sido observadas con análogos de azúcar como 2-deoxy glucosa (2-DG) y manosa, los cuales aún siendo fosforilados por la HXK no pueden ser metabolizados y son capaces de desencadenar la represión o activación de ciertos genes fotosintéticos (Jang *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que la señalización de la Glc no se relaciona únicamente con una vía metabólica (Jang *et al.*, 1994). Por otro lado la evidencia acerca de una vía totalmente independiente de HXK proviene de las observaciones con análogos de Glc como 6-deoxy glucosa (6-DG) y 3-oximetilglucosa (3-OMG) en donde ambos azúcares análogos son transportados a través de la membrana pero no son fosforilados por HXKs, activando la maquinaria génica de genes que codifican para invertasas de la pared celular (CIN), sacarosa sintetasas (SuSy) y fenilalanina amoniolasa (PAL) (Roitsch *et al.*, 1995) (Fig. 1).

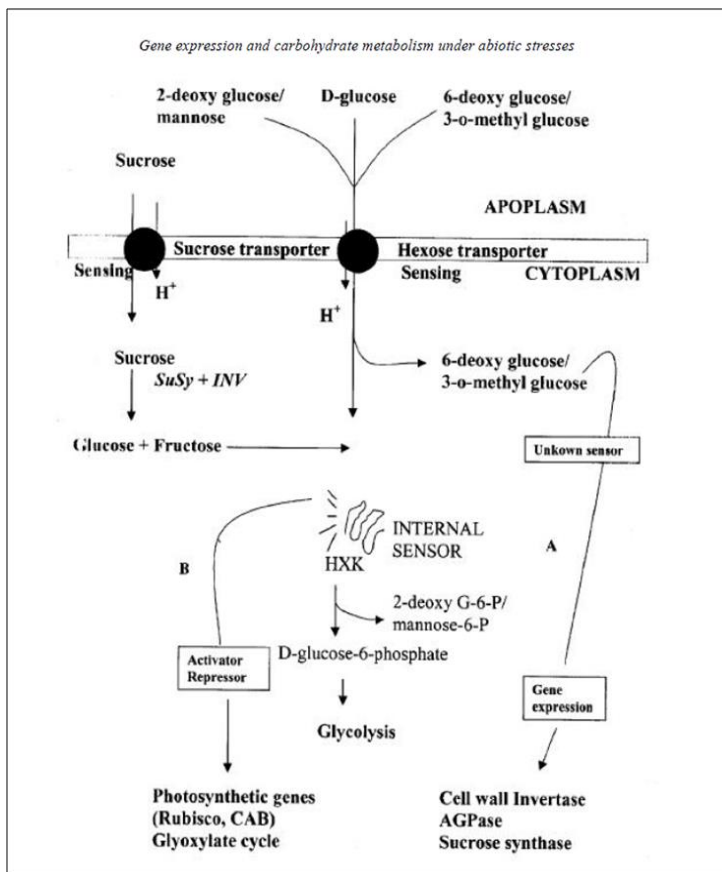


Fig. 1. Vías de señalización de la Glc en plantas Vasculares. A) Vía independiente de HXK, B) Vía dependiente de HXK e independiente de metabolismo. Tomado de Gupta *et al.* (2005).

Los azúcares como la Glc son detectados en el interior de las células vegetales mediante la interacción de la molécula de azúcar y una proteína sensora. Al

interaccionar ambas, se activa una cascada de señalización que dará lugar a una serie de eventos entre ellos la expresión de ciertos de genes (Gupta y Kaur, 2005). Arabidopsis se ha utilizado como organismo modelo para diversos estudios sobre la señalización de los azúcares en el desarrollo en plantas superiores (Taíz y Zeiger, 2004). La figura 1 muestra la percepción y señalización de azúcares en dicha planta modelo. La Glc y la Frc son transportadas dentro de la célula por medio de transportadores de hexosas o movilizadas del almidón y Sac citosólica o vacuolar. Así, la Glc, siendo la principal fuente de energía empleada por organismos unicelulares, plantas y animales, entra al metabolismo después de ser fosforilada por la HXK (Rolland *et al.*, 2006).

Un elemento clave en la señalización de la energía de la planta es KIN10/11 que también forma parte de la mediación de la reprogramación masiva de la transcripción (a través de factores de transcripción bZIP) y el control post-traducional de las enzimas (Hanson *et al.*, 2008). Por otro lado, los encargados de inhibir la actividad de KIN10/11 son los azúcares fosfato, especialmente la Glucosa-6-fosfato (Baena-González *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que la trehalosa-6-fosfato (T6P) puede actuar como molécula reguladora del metabolismo de la trehalosa (Tre), mediado por T6P sintasa y por enzimas T6P fosfatasas (TPP) (Kolbe *et al.*, 2005). KIN10/11 controlan la expresión y el estado de fosforilación de varias de las proteínas TPS clase II, hasta el momento dichas proteínas son de actividad y función desconocida (Hanson *et al.*, 2008).

### Otros sensores de Glc (independientes de HXK)

En la figura 2 representa los modelos de percepción y señalización de azúcares en Arabidopsis. Un receptor acoplado a una proteína G, señalizado por RGS1 y GPA1, e implicado en la percepción de Glc extracelular y la señalización a través de THF1, se localiza en los plástidos (Johnston *et al.*, 2007). En plantas superiores como Arabidopsis, la Sac es el principal azúcar transportado y se sabe que tiene efectos específicos, los cuales no son disparados por los productos de su hidrólisis (Glc y Frc)



Otra hormona que interactúa con las señales de azúcar en el control del desarrollo de la semilla y desarrollo post-germinativo (Sou Li *et al.*, 1998), es el etileno (Fig. 3). Así mismo, estudios realizados en mutantes de *Arabidopsis* insensibles a Glc (*gin 2*) mostraron insensibilidad al efecto de las auxinas; en contraste, se observaron hipersensibles a los efectos de las citocininas (Moore *et al.*, 2003). Las auxinas forman parte de procesos relacionados con la elongación celular, floración, geotropismo, entre otras, y las citocininas están relacionadas con el desarrollo temprano de la semilla (Ramon *et al.*, 2008) y el retraso de la senescencia (Moore *et al.*, 2003).

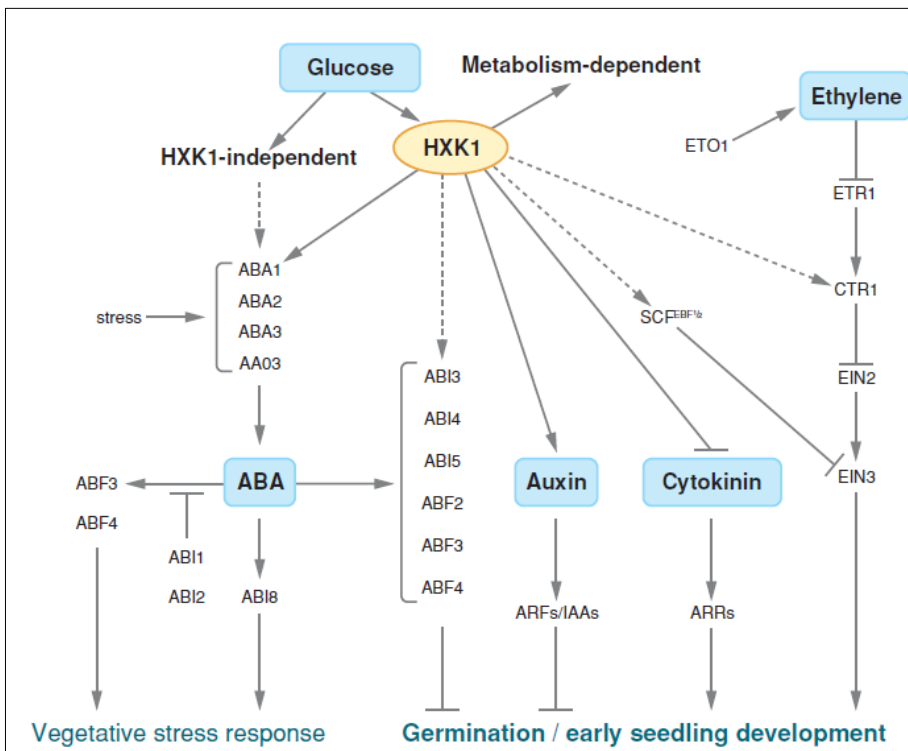


Fig. 3. Modelo de interacción entre azúcares-fitohormonas en *A. thaliana*. Tomado de Rolland *et al.* (2006).

### Generalidades de Briofitas

Las briofitas son el grupo de plantas más primitivas de la tierra (Glimn-Lacy, 2006). Se dividen en tres categorías: Musgos, Antocerotes y Hepáticas (Fig. 4).



Fig. 4 A) Hepática *Marchantia chenopoda*, B) Antocero *Anthocero phyta* sp. C) musgo *Physcomitrella patens*. Tomado y modificado de <http://www3.inecol.edu.mx/briologia/index.php/clasificacion-de-las-briofitas/antoceros>.

Las briofitas son consideradas plantas no vasculares, es decir, plantas que carecen de un sistema especializado para el transporte de agua y nutrimentos a diferencia de las plantas vasculares que poseen xilema y floema (Goffinet y Shaw, 2009). Las briofitas poseen dos fases en su ciclo de vida, el gametofito y el esporofito, por lo tanto comparten un ciclo de vida haploide – diploide, siendo la fase haploide la dominante, mientras que en angiospermas (plantas con flores) tienen un ciclo de vida diploide dominante (Nishiyama *et al.*, 2003).

## Anatomía y ciclo de vida de los musgos

### Morfología de los musgos

Los musgos son el grupo más numeroso y diverso de briofitas, se conocen cerca de 12,800 especies a nivel mundial (Delgadillo, 2003). Están formados por un gametóforo, un esporofito y rizoides. El gametóforo (también llamado gametofito) y el esporofito, viven ligados toda su vida ya que el esporofito realiza poca fotosíntesis mientras que el gametóforo es mayormente fotosintético por lo que el esporofito toma los nutrientes necesarios del gametóforo para su desarrollo (Goffinet y Shaw, 2009). El esporofito consta de tres partes fundamentales: pie, seta y cápsula (Fig. 5 A) (Shaw y Renzaglia,

2004). Esta última posee una estructura llamada opérculo, que asemeja a una tapa (Delgadillo, 2003). Al madurar, el opérculo cae y deja al descubierto 1 o 2 ciclos de apéndices que en conjunto se denominan peristoma (Fig. 5 B). El peristoma es importante ya que es el encargado de regular la liberación de las esporas al ambiente y en presencia de luz y agua comienza de nuevo el ciclo de vida del musgo (Delgadillo, 2003).

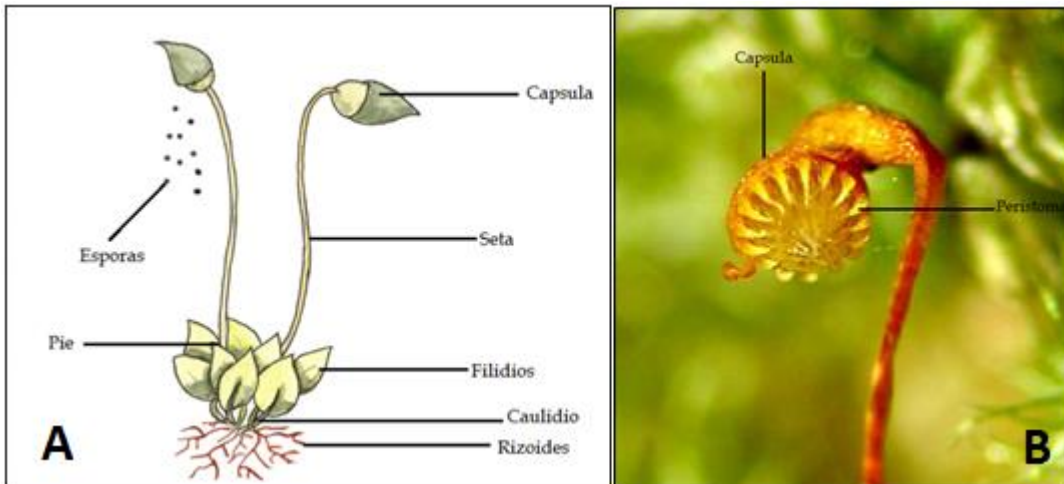


Fig. 5. A) Estructura y componentes de un musgo. Tomado de [http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran\\_familia/plantas/musgos/musgo\\_s.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/musgos/musgo_s.html) B) Cápsula de musgo. Tomado y modificado de <http://www.briolat.org/>

### Ciclo de vida de los musgos

El ciclo de vida de los musgos (Fig. 6) inicia cuando las esporas caen al suelo y bajo condiciones de luz y agua las esporas germinan dando lugar a una estructura filamentosa llamada protonema (etapa juvenil del musgo) (Goffinet y Shaw, 2009).

El protonema se compone de dos tipos celulares: cloronema y caulonema (Fig. 7) (Schumakerl y Dietrich, 1997). El caulonema da lugar a yemas o brotes que por mitosis forman estructuras llamadas gametóforos. Estos contienen los gametos masculinos (anterozoos) que se encuentran en el anteridio; y femeninos, que se encuentra en el arquegonio (Goffinet y Shaw, 2009).

La fecundación se presenta siempre en un ambiente saturado de agua donde los gametos masculinos nadan hacia al arquegonio, produciéndose así la fecundación (Delgadillo, 2003).

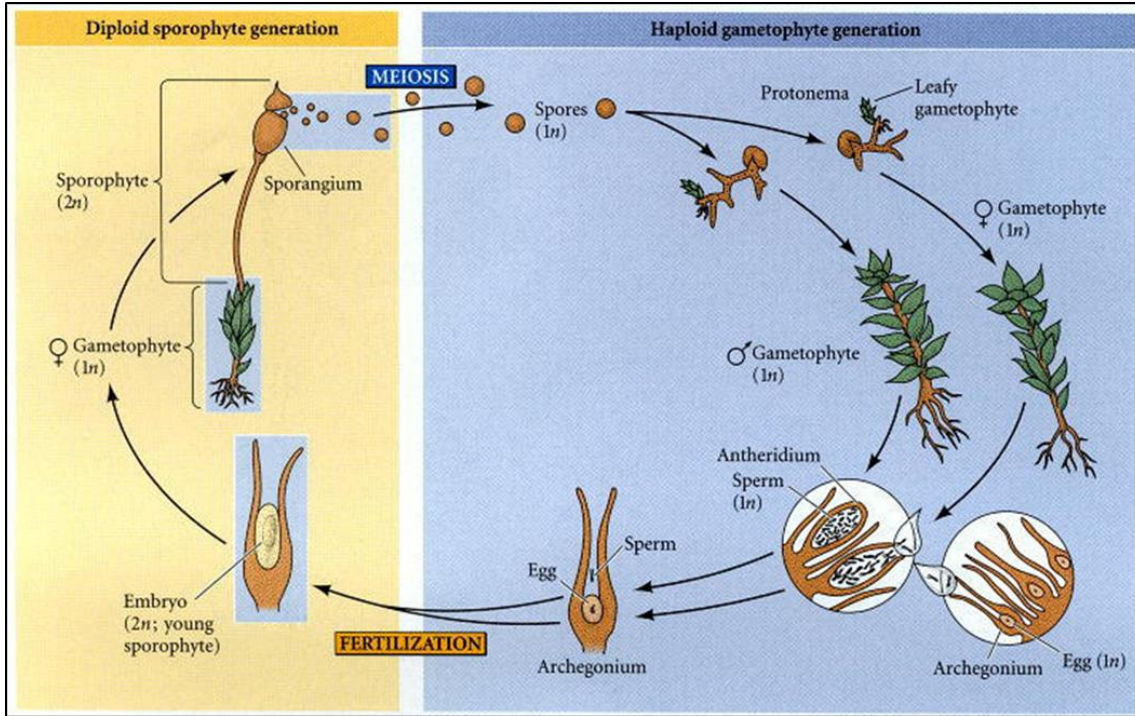


Fig. 6. Ciclo de vida del musgo *Polytrichum* sp. Tomado de Scott F (2000).

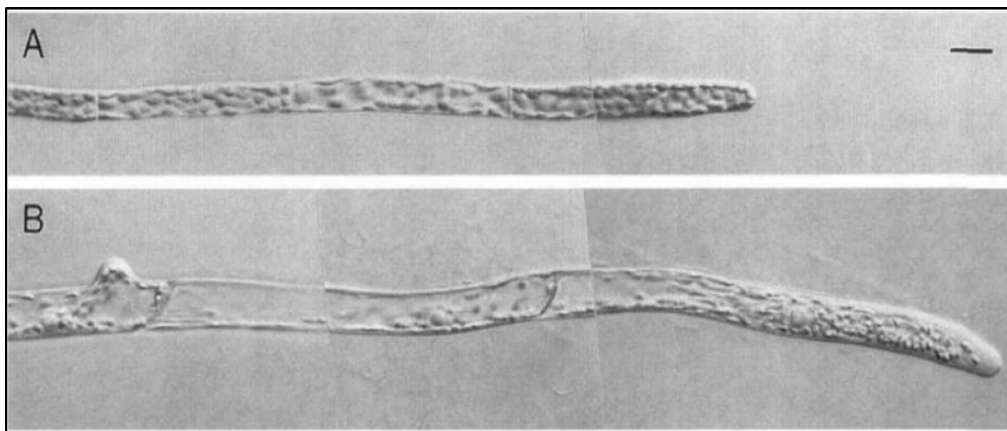


Fig. 7. Cloronema (A) y Caulonema (B). Tomado de Schumakerl y Dietrich., 1997

### Papel de las fitohormonas en el desarrollo de los musgos

Los grupos de fitohormonas clásicas que se han identificado químicamente en briofitas y de las cuales se sabe que tienen un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de *P. patens* son auxinas, citocininas, ABA y etileno (Decker et al., 2006; Yasumura et al., 2007). En estudios en *P. patens* se reporta conforme la concentración de ABA aumenta (0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ) se inhibe el crecimiento del musgo, (Fig. 8) (Thelander et al., 2005). ABA no solo causa cambios en el crecimiento y desarrollo de los musgos, sino que también regula la formación y número de células llamadas braqueocitos, las cuales son células tolerantes a la desecación, capaces de dar lugar a protonema (Schnepf y Reinhard, 1997).

Se ha reportado que la citocínina BAP en altas concentraciones posee de igual forma un efecto inhibitorio en el tamaño de *P. patens* (Fig. 9) (Thelander et al., 2005; Ashton et al., 1979) e induce la formación de tejido calloso (Ashton et al., 1979).

Por otro lado, las auxinas son las encargadas de la diferenciación de cloronema a caulonema (Ashton et al., 1979). Esta etapa es muy importante en el desarrollo de los musgos ya que la formación de caulonema dará lugar a la formación de brotes, (Ashton et al., 1979). La presencia de citocininas en bajas concentraciones induce dicha formación, lo que dará paso a la etapa adulta del musgo, el gametóforo (Ashton et al., 1979).

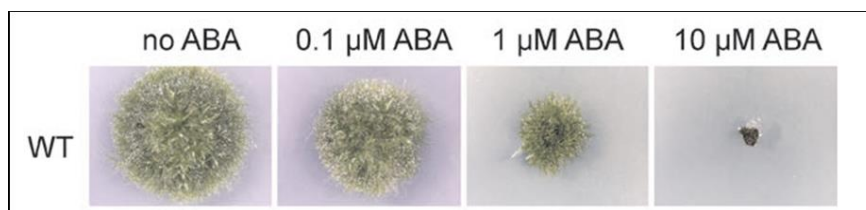


Fig. 8 Efecto inhibitorio de ABA a diferentes concentraciones en el crecimiento expansivo del musgo *P. patens*. Tomado de Thelander et al. (2005).

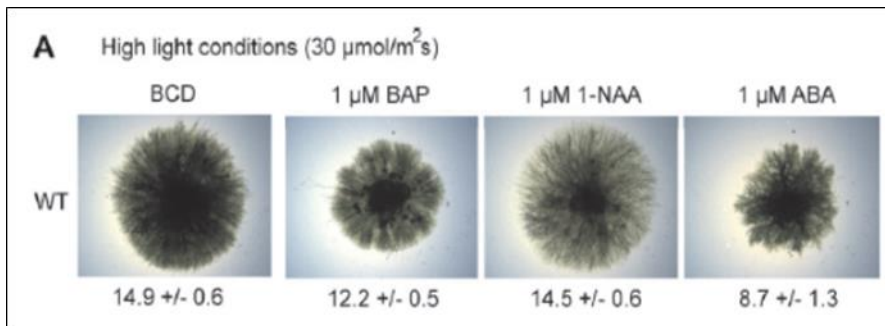


Fig. 9 Efecto inhibitorio en el tamaño del musgo *P.patens* en adición de 1μM de BAP. Tomado de Thelander *et al.* (2005).

A diferencia de las hormonas mencionadas anteriormente, casi no se han reportado efectos de las giberelinas (GAs) en musgos (Decker *et al.*, 2006). Algunos trabajos como el de Chaban *et al.*, (1999) en *Ceratodon purpureus* y *Pottia intermedia*, mencionan una interferencia en el gravitropismo cuando se aplican GAs de manera exógena.

Sabovljević y colaboradores (2010) reportaron el efecto de la giberelina (GA<sub>3</sub>) en protonemas del musgo *B. argenteum*, observando que las concentraciones óptimas para un mayor crecimiento diametral son de 3 y 10 μM de GA<sub>3</sub>. Por otro lado, el índice de formación de brotes aumenta en GA<sub>3</sub> 3 μM y disminuye ligeramente en 10μM.

### Tolerancia a estrés abiótico en briofitas

El estrés puede definirse como: “cualquier factor ambiental ya sea biótico o abiótico que reduzca algún proceso fisiológico (por ejemplo, crecimiento o fotosíntesis) por debajo de la tasa máxima que podría alcanzar” (Lambers *et al.*, 1998).

Se considera estrés abiótico primario aquél que es causado por factores como la sequía, la salinidad, el frío, el calor, los contaminantes ambientales, la hipoxia, el daño mecánico y la deficiencia nutricional (Wang *et al.*, 2003). De forma secundaria, también se incluye al estrés osmótico y oxidativo causados por el estrés primario. El estrés abiótico provoca cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan el crecimiento y la productividad de las plantas (Wang *et al.*, 2003).

Existen algunas plantas vasculares y no vasculares capaces de ser tolerantes a diferentes tipos de estrés (Wang *et al.*, 2003). Algunas briofitas tienen la capacidad de tolerar el estrés por la desecación, lo cual implica una pérdida del 90% del agua libre intracelular (Fig. 10) (Wood, 2007). Dichas plantas primitivas poseen una morfología y fisiología que les ha permitido soportar la falta de agua por periodos largos de tiempo y, cuando se presentan de nuevo las condiciones óptimas de humedad, reanudan su metabolismo (Wang *et al.*, 2003).

Se cree que esta característica de tolerancia a la desecación proviene de las algas acuáticas que colonizaron la tierra hace millones de años (Melvin *et al.*, 2000). La primera planta proveniente del agua y que colonizó la tierra debió ser poikilohídrica; esta planta era capaz de equilibrar el contenido interno de humedad con el ambiente externo (Melvin *et al.*, 2000). Con el paso del tiempo, dicha planta evolucionó por lo que fue perdiendo la capacidad de tolerar la desecación y adquirió un sistema de transporte de agua eficiente, lo que conocemos actualmente como xilema y floema en plantas vasculares (Proctor, 1990).

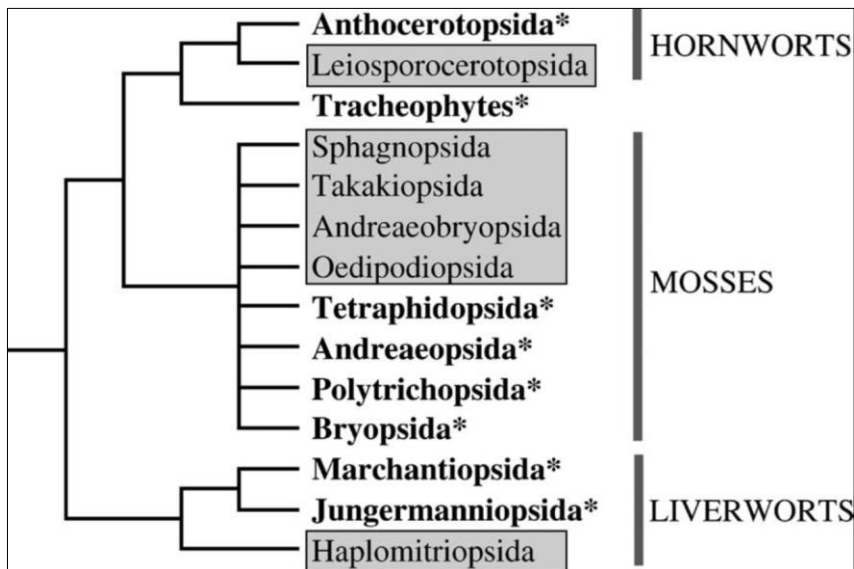


Fig. 10 Clases de briofitas existentes actualmente. En las clases marcadas con asterisco se han reportado especies

Las especies de musgos tolerantes a la desecación clasificadas por Goffinet y Buck (2004) se encuentran en el Anexo 1, tablas 1- 4.

## ANTECEDENTES

### Antecedentes del sistema biológico de estudio

Ríos-Meléndez (2010) analizó la tolerancia a la desecación de *P. replicatum* mediante el protocolo de Austin establecido para briofitas (Wood, 2007). Los resultados de su estudio clasifican a *P. replicatum* como especie A (B); es decir, una especie altamente tolerante a la desecación y capaz de regular su contenido interno de agua respecto al ambiente en que se encuentre, en un periodo de 10 min. En dicho trabajo, las esporas de origen multiespórico y protonemas de *P. replicatum* fueron sometidos a estrés osmótico por manitol y sorbitol (50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mM) y NaCl (50, 100, 200, 300 y 400 mM). Las observaciones fenotípicas llevaron a concluir que esta especie tolera estrés osmótico y salino durante la germinación, así como en la etapa de protonema.

Por otro lado, para que las plantas toleren diferentes tipos de estrés necesitan activar o reprimir ciertos genes (Wang *et al.*, 2003). Existen dos tipos de respuesta génica ante el estrés abiótico; la rápida en la que se expresan genes de respuesta inmediata ante el estímulo; y la tardía, en la que se expresan genes de protección (Wang *et al.*, 2003). Trabajos como el de Valadez-Hernández (2013) reportan que al deshidratar protonemas (de cultivo monoespórico) de *P. replicatum* durante 10 minutos a una humedad relativa (HR) de 30%, *P. replicatum* pierde el 30% de su peso. Se observó que el 99.5% de los genes no cambian de manera significativa su nivel de expresión, el 0.4% se reprime y el 0.1% se induce, lo que indica que este nivel de deshidratación no parece representar un estrés que logre efectuar cambios en su transcriptoma. Además, a los 30 minutos de someter a *P. replicatum* a este estrés, pierde el 70% de su peso y el porcentaje de genes con cambios asciende al 7.4%. Se concluyó que *P. replicatum* requiere al menos 10 minutos de estrés para iniciar la expresión de su maquinaria de protección, mientras que a los 30 minutos, el estrés provoca la inducción de 390 genes relacionados mayoritariamente con mecanismos de transducción de señales (44), 46 genes relacionados con modificaciones postraduccionales/recambio celular/chaperonas y 47 genes relacionados con traducción/estructura de ribosomas y para su biogénesis, así como 7 genes que involucran a la estructura y dinámica de la cromatina, sugiriendo un

alto requerimiento de síntesis *de novo* de proteínas que guíen las respuestas para contrarrestar los efectos del estrés. Es hasta los 50 minutos de someter a este musgo al estrés por deshidratación donde *P. replicatum* pierde 91% de su peso, siendo este dato la máxima capacidad de pérdida de agua en esta especie.

Además, *P. replicatum* no solo tolera el estrés por desecación, sino que también es capaz de tolerar diferentes tipos de estrés. Un trabajo que profundiza en lo anterior es el de Morales-Eliosa (2010), en el que *P. replicatum* fue sometido a estrés osmótico causado por sorbitol y manitol en concentraciones de 400 a 1000 mM durante 25 días. En dicho estudio se reporta que este musgo es tolerante a ambos agentes osmóticos hasta la concentración de 600 mM, pero que en concentraciones superiores (700 mM-1000 mM) provocan un fenotipo albino en los protonemas. Sin embargo, dichos protonemas tuvieron la capacidad de recuperarse al ser transferidos a medio control recuperando su pigmentación y desarrollo. Este musgo también mostró tolerancia a estrés salino en concentraciones de 200-500 mM NaCl; y, a concentraciones superiores a 500 mM (600 mM) son capaces de recuperarse. Por último, Morales-Eliosa (2010) observó que *P. replicatum* es tolerante a temperaturas congelantes de -10°C, -20°C y -76°C por tiempos prolongados (24 hrs a 7 días) conservando su pigmentación y desarrollo. En el trabajo de dicho autor se resalta que un pre-tratamiento de tan sólo 24 hrs con ABA exógeno incrementa la capacidad de recuperación a dichas condiciones de estrés abiótico severo, aunque no es indispensable.

### **Papel de la Glc en el desarrollo de los musgos**

Recientemente, las investigaciones en relación al efecto de los azúcares en el desarrollo de las plantas se han extendido a plantas inferiores como los musgos. Moreno-Velázquez (2013) utilizó concentraciones de Glc bajas (100 mM), altas (300 y 500 mM) y muy altas (700 y 1000 mM), por 30 días en protonemas del musgo *P. patens*, musgo considerado no tolerante a la desecación. Se observó que en concentraciones bajas de Glc (100 mM) se obtiene un crecimiento expansivo mayor y se promueve la formación y crecimiento de gametóforos a diferencia del control y el control iso-osmótico (StI), por lo que se concluyó que estas respuestas son específicas

por el estímulo de la Glc y completamente independientes del efecto osmótico. En cambio, en concentraciones altas de Glc (300 y 500mM), la formación de gametóforos es abatida, posiblemente debido a un efecto osmótico. Bajo condiciones de Glc 300 mM se observó estimulación en la producción de biomasa pero no en el crecimiento expansivo. La eficiencia fotosintética a esta concentración es favorecida pero reprimida a 500 mM. Además, a concentraciones muy altas de Glc (700 y 1000 mM) se inhibe el crecimiento diametral y la formación de gametóforos y los tejidos mostraron un fenotipo clorótico y una disminución de la eficiencia fotosintética. Estos efectos se hacen más severos conforme se aumenta la concentración de Glc (máxima 1000 mM).

Por su parte, Chamorro-Flores (2011) evaluó el efecto de diferentes concentraciones de Glc en protonemas del musgo *B. billarderi* Schwägr totalmente tolerante a la desecación durante 15 días. Se observó que la concentración más baja de Glc (100 mM) causó inhibición en la expansión del musgo y una mayor densidad de los tejidos, por lo que se concluyó que esta concentración favorece el desarrollo de los protonemas. Por el contrario, en 300 mM el crecimiento fue arrestado. Concentraciones más altas (500-1000 mM) no se observaron diferencias evidentes entre los fenotipos de los protonemas expuestos a Glc y sorbitol (Stl), concluyendo que a partir de 300 mM el crecimiento del musgo *B. billarderi* se inhibe. En esta especie, la eficiencia fotosintética, tras 15 días de tratamiento disminuye conforme se incrementa la concentración de Glc.

## JUSTIFICACIÓN

Los azúcares son fundamentales para la regulación en el desarrollo y crecimiento de las plantas. Hasta el momento gran parte de la información acerca de las vías de señalización de los azúcares es abordada en plantas vasculares, por lo que el estudio se hace aún más difícil ya que las respuestas de la Glc varían dependiendo de la etapa del desarrollo de estas, el tipo de tejido y tipos celulares a lo largo de las diferentes estructuras de la planta. Recientemente, el estudio de los azúcares como molécula de señalización se ha abierto camino en plantas no vasculares como son los musgos, ya que representan un modelo ideal, puesto que poseen características morfológicas, fisiológicas y genéticas que hacen de este un organismo factible como modelo experimental. Este trabajo comprende el estudio de *P. replicatum*, un musgo tolerante a la desecación, en respuesta al efecto de la Glc con el objeto de elucidar la posible conservación del efecto de este azúcar en el desarrollo de este musgo en comparación con otros musgos tanto tolerantes como no tolerantes a la desecación. Así mismo este trabajo analiza la posible interconexión de las vías de señalización activadas por Glc y hormonas vegetales, misma que ocurre en la planta vascular *A. thaliana* y se desconoce en su totalidad en plantas no vasculares.

## HIPÓTESIS

- Si la Glc modula el desarrollo y la fotosíntesis de *A. thaliana*, una planta vascular, entonces se espera que la Glc module el desarrollo y fotosíntesis del musgo *P. replicatum*, una planta no vascular, en función de la concentración de la misma y de forma independiente del efecto osmótico.
- Si la Glc representa una señal que regula el desarrollo y fisiología de un musgo no tolerante a la desecación (*P. patens*), entonces se espera que la Glc module el desarrollo y fotosíntesis de un musgo tolerante a la desecación como *P. replicatum*.
- Si existe intercomunicación de vías de respuesta a Glc y fitohormonales tanto en plantas vasculares (*A. thaliana*) como en no vasculares (*P. replicatum* y *P. patens*) entonces esta intercomunicación surgió muy temprano en la evolución de las plantas terrestres.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar el efecto de la glucosa en el desarrollo de la briofita mexicana tolerante a estrés abiótico extremo *P. replicatum* bajo condiciones *in vitro*.

### Objetivos particulares

- Analizar el fenotipo de *P. replicatum* en respuesta a diferentes concentraciones de Glc.
- Analizar la eficiencia fotosintética de *P. replicatum* en respuesta a diferentes concentraciones de Glc.
- Determinar la participación de las vías de señalización de Glc dependientes de HXK (Man) e independientes de metabolismo en el fenotipo de *P. replicatum*.
- Determinar la posible intercomunicación de vías de respuesta a Glc y fitohormonales en el desarrollo de dos briofitas (*P. patens* y *P. replicatum*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estrategia Experimental

Para lograr los objetivos del proyecto se realizó la siguiente estrategia experimental (Fig. 11).

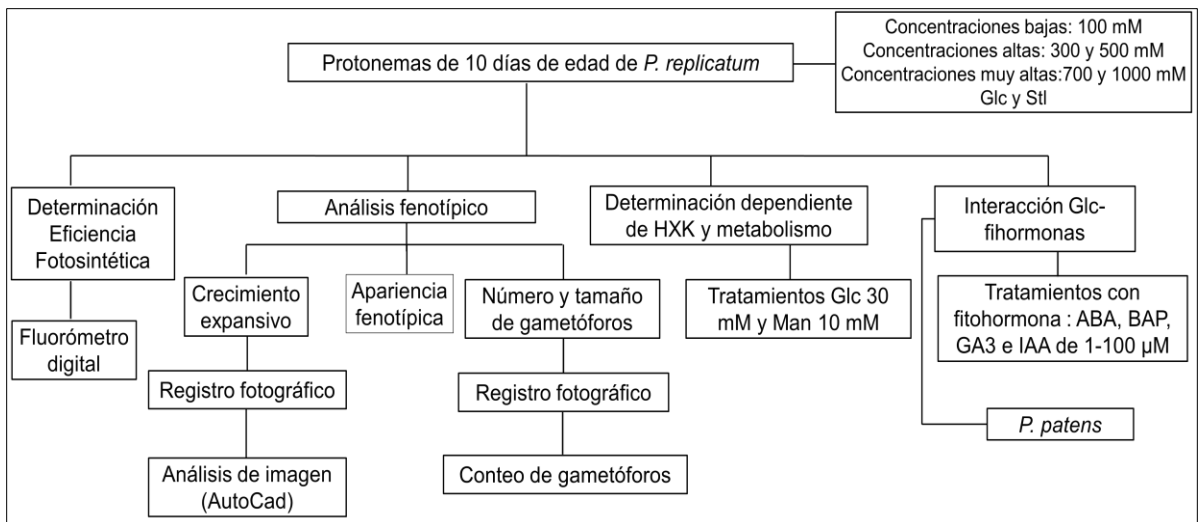


Fig. 11 Estrategia Experimental

Se llevaron a cabo tres experimentos biológicamente independientes de cada abordaje experimental, cada uno con tres cajas de Petri con tres muestras de tejido protonemal en micro-membranas de celofán por cada tratamiento, para verificar la reproducibilidad de los resultados.

Únicamente para el experimento relacionado con la evaluación del efecto de la Glc o su análogo (Man), en presencia de fitohormonas, en el desarrollo de *P. patens* se realizaron dos experimentos biológicamente independientes cada uno con tres cajas de Petri y con tres muestras de tejido protonemal en micro-membranas de celofán por tratamiento.

## Material biológico

Para los experimentos realizados con *P. replicatum* se utilizó una línea monoespórica (EM6) cultivada *in vitro* obtenida por Morales - Elosa (2010) en el LBMP-CIBA. Por otro lado, los tejidos de *P. patens* (Gransden), se obtuvieron a partir de una línea monoespórica con la que cuenta el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (LBMP), originalmente donada por la Dra. Verónica Lira Ruán de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

## Descripción de la especie en estudio

*Pseudocrossidium replicatum* es un musgo que crece sobre suelo o roca, incluyendo lava, concreto y adobe. Se distribuye desde los 750 a 2590 m. Su distribución en México abarca los estados de: Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas. También se distribuye en el suroeste de Estados Unidos y al norte de los Andes de América del sur (Sharp *et al.*, 1994). Su clasificación taxonómica se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del musgo tolerante a la desecación *P. replicatum*. Tomado de <http://www.ncbi.nlm.gov/taxonomy/?term=pseudocrossidium+replicatum>.

Nombre científico	<i>Pseudocrossidium replicatum</i>
Reino	Viridiplantae
Phylum	Bryophyta
Clase	Bryopsida
Orden	Pottiales
Familia	Pottiaceae
Genero	<i>Pseudocrossidium</i>

## Condiciones de crecimiento

Los tejidos utilizados se mantuvieron en un cuarto de cultivo vegetal *in vitro* con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas obscuridad a una temperatura de 23° C, a una intensidad de luz de 40 Fc y una HR de 30 %.

## Propagación del material vegetal

Para el mantenimiento del tejido de *P. patens* y *P. replicatum* se realizaron propagaciones periódicas cada 5 días para *P. patens* y cada 7 días para *P. replicatum* en medio PpNH<sub>4</sub> líquido y sólido bajo condiciones de cultivo *in vitro* con el objetivo de que el tejido se conserve joven (protonema). Para la preparación de 1L de medio PpNH<sub>4</sub> se disolvió en agua destilada 1ml de MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (500X) ,1 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (500X), 1 ml de CaNO<sub>3</sub>•4H<sub>2</sub>O (500X), 12.5 mg de FeSO<sub>4</sub>, 1 ml de tartrato de amonio (500 X) y 500 ml de micro elementos. Estos últimos están compuestos por H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, KI, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O. El medio PpNH<sub>4</sub> sólido se prepara agregando 7g de agar (Sigma A9799-1KG) (Benzanilla, 2008).

La propagación se realizó en la campana de flujo laminar procurando la asepsia en todo momento. El procedimiento se describe a continuación:

1. Se colocaron 0.5 ml de tejido de vegetal de *P. replicatum* en un tubo falcon de 15 ml y se aforó con agua desionizada a 4 ml (Fig. 12 A).
2. Se trituró el tejido contenido en el tubo falcon con ayuda de un homogeneizador (Power homogenizer 125, Fisher Scientific, Massachusetts, USA) hasta obtener una mezcla homogénea (se requieren tres sesiones de 6 segundos cada una con el homogeneizador a la máxima potencia) (Fig. 12 B).
3. El tejido homogéneo se colocó en matraces estériles de 250 ml, estos matraces contenían 50 ml de medio líquido PpNH<sub>4</sub>. Los matraces se cerraron con tapón de algodón. Al ser cerrado el matraz, se cubrió la boca de este con cinta plástica para evitar contaminación.

Para propagación en medio sólido se colocó 1 ml de tejido recién homogeneizado en cajas Petri (60 X 15 cm) adicionadas con 13 ml de medio PpNH<sub>4</sub> sólido.

4. Finalmente, los matraces fueron colocados en un agitador y las cajas de Petri en estantes dentro del cuarto de cultivo con el fotoperiodo antes mencionado (Fig. 13 A y B).

Para verificar la axenicidad del tejido se realizaron pruebas de contaminación en medio LB (medio utilizado para mantenimiento de bacterias). Dichas pruebas fueron incubadas a 30°C y 37°C, temperaturas ideales para crecimiento bacteriano y hongos. Las pruebas se mantuvieron en incubación, monitoreandolas todos los días hasta la siguiente propagación. En caso de que el tejido resultara contaminado se procedía a la eliminación de este.



Fig. 12. A) Adición de 4 ml de agua destilada al tubo falcon con tejido vegetal para su posterior homogenización. B) Trituración del tejido con ayuda del homogeneizador (Power homogenizer 125, Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

### Elaboración y mantenimiento de “stocks” de tejido protonemal

Para que el tejido protonemal de *P. replicatum* y *P. patens* fuese conservado para su uso posterior, se realizaron “stocks” a diferentes temperaturas.

El procedimiento se inició mediante la propagación del tejido vegetal como se mencionó anteriormente. El tejido vegetal recién propagado fue colocado en cajas de Petri de 60X15mm adicionadas con 13 ml de medio sólido PpNH<sub>4</sub> y en tubos viales de 5 ml, estos últimos contenían 3ml de medio sólido PpNH<sub>4</sub>, y se agregaron 500µl de tejido vegetal por vial (2 tubos viales). Cada uno de los tubos y cajas de Petri fueron sellados

cuidadosamente con cinta parafilm. Los tubos viales fueron colocados en el cuarto de cultivo a 22°C y la caja de Petri en un refrigerador a una temperatura de 4°C.

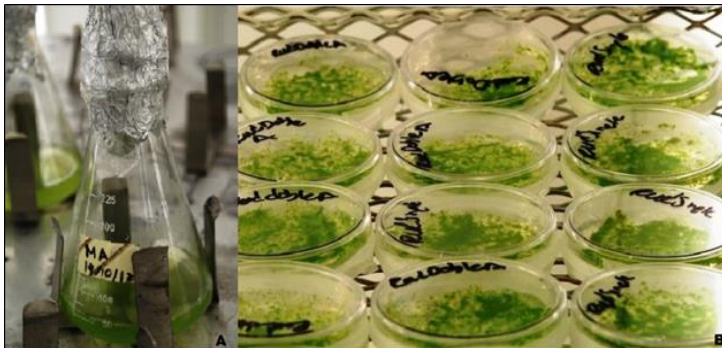


Fig. 13 A) Matraz estéril de 250 ml con tejido joven. B) Cajas de Petri de 60 X 15 mm con tejido recién homogeneizado.

### Siembra de tejido protonemal en membranas de celofán

Se iniciaron los experimentos con la siembra de tejido protonemal de *P. replicatum* y *P. patens* en membranas de celofán esterilizadas de 0.7 cm de diámetro (Fig. 14 A). Para esto fue necesario utilizar 6 cajas de Petri grandes adicionadas con medio PpNH<sub>4</sub>. Las cajas de Petri de 100 X 15 mm contenían 60 micro membranas de celofán, cada una de las cuales fueron inoculadas con 4 µl de tejido protonemal recién propagado (Fig. 14 B). Finalizada la siembra de tejido protonemal, las cajas fueron selladas con cinta adhesiva microporosa (3 M micropore, 1.25 cm) y colocadas en el cuarto de cultivos vegetales *in vitro* durante 10 días.



Fig. 14. A) Colocación de membranas esterilizadas de celofán de 0.7 cm de diámetro en cajas de Petri adicionadas con medio PpNH<sub>4</sub> B) Siembra de los 4 µl de tejido protonemal recién propagado en las membranas de celofán (B).

### Tratamientos en Glc y Stl en *P. replicatum*

Para cumplir con el objetivo número uno se consideró concentraciones bajas (100 mM), altas (300 y 500 mM) y muy altas (700 y 1000 mM) de Glc. Los protonemas de 10 días de edad de *P. replicatum* fueron transferidos a cajas de Petri de 60 X 15 mm que contenían 13 ml de medio PpNH<sub>4</sub> sólido adicionado con las diferentes concentraciones de Glc. Se utilizó Stl (0, 100, 300, 500, 700, 1000 mM) como control iso-osmótico. Finalmente las cajas de Petri pequeñas fueron selladas con cinta parafilm y colocadas en el cuarto de cultivos vegetales *in vitro*.

La cuantificación de gametóforos se realizó únicamente en las concentraciones de Glc y Stl 0,100 y 300 mM.

### Tratamientos con fitohormonas en el musgo modelo *P. patens*

El primer experimento se realizó con las cuatro fitohormonas y las tres concentraciones diferentes mencionadas anteriormente. Este experimento sirvió para la estandarización del: tiempo de observación, los días para realizar el registro fotográfico, el sellado de las cajas de Petri y los procedimientos para la toma de datos.

Para la realización de los experimentos se requirió tejido vegetal de 10 días de edad. Transcurridos los 10 días de crecimiento del musgo, se seleccionaron las membranas de celofán con el crecimiento homogéneo. Las membranas fueron transferidas a cajas de Petri de 60 X 15 mm que contenían 13 ml de medio sólido PpNH<sub>4</sub> adicionado con las diferentes concentraciones de las hormonas vegetales a evaluar (Tabla 2).

Tabla 2. Hormonas vegetales utilizadas, concentraciones de estas así como la cantidad de “stocks” utilizados para cada una de ellas y el solvente utilizado para la realización de los “stocks” de fitohormonas.

<b>Fitohormonas</b>	<b>Marca y No. De catálogo de fitohormonas</b>	<b>Concentración de Stocks</b>	<b>Disolventes de Stocks</b>
<b>ABA</b>	Plant media 714201	2 mM	NAOH-1 normal
<b>BAP</b>	Sigma 13155	2 mM	NAOH-1 normal
<b>GA<sub>3</sub></b>	Gold bio G-120-10	10 mM	Etanol Absoluto
<b>IAA</b>	Caisson labs AO36-100MG	10 mM	NAOH-1 normal

Con base en estas observaciones se llevó a cabo un segundo experimento seleccionando las concentraciones de fitohormonas que mostraron mayores diferencias en la apariencia visual (solamente cualitativa) del tejido protonemal.

Una vez estandarizadas las condiciones y seleccionados los días de registro fotográfico, concentraciones y fenotipos a evaluar (Tabla 3), se realizó un experimento biológicamente independiente (Anexo 3).

Fitohormona	Concentración	Parámetros a evaluar	Registro Fotográfico
<b>BAP</b>	0.1 y 10 $\mu$ M	CE, número y tamaño gametóforos.	Días: 0, 5, 15, 30
<b>GA3</b>	10 $\mu$ M	CE, número y tamaño gametóforos.	Días: 0, 5, 15, 30
<b>ABA</b>	0.1 y 10 $\mu$ M	CE, número y tamaño gametóforos.	Días: 0, 5, 15, 30
<b>IAA</b>	5 $\mu$ M	CE, número y tamaño gametóforos	Días: 0, 5, 15, 30

Procedimiento de preparación de tratamientos fitohormonales:

- 1.- Se vaciaron 13 ml de medio de cultivo PpNH<sub>4</sub> sólido adicionado con las diferentes concentraciones de las fitohormonas en cajas de Petri de 60 X 15 mm.
- 2.- Una vez gelificado, el medio de cultivo en las cajas, se procedió a traspasar las micromembranas con tejido protonemal de 10 días de edad. Para evitar contaminación en el traspaso de las micromembranas se flamearon las pinzas de punta fina cada vez que se colocaba una membrana dentro de la caja de Petri con el medio adicionado.
- 3.- Las cajas fueron selladas con cinta parafilm y colocadas en el cuarto de cultivo *in vitro*.

Cabe señalar que para el caso de la fitohormona BAP se realizó un pre tratamiento de 24 horas en protonemas de 9 días de edad.

Las micro membranas fueron monitoreadas durante 30 días con el fin de analizar las diferencias fenotípicas del musgo *P. patens* a diferentes concentraciones de hormonas

vegetales. Este monitoreo requirió un registro fotográfico cada 5 días para evaluar los cambios en el fenotipo del musgo *P. patens*.

Finalizados los 30 días de monitoreo y evaluación del fenotipo, se seleccionaron nuevamente los días para el registro fotográfico y las concentraciones de las hormonas con los fenotipos más evidentes para experimentos posteriores.

### Tratamientos para determinación de interacción de vías de Glc/Man-fitohormonas

Los tejidos protonemales de *P. patens* y *P. replicatum* de 10 días en micro-membranas fueron transferidos a cajas de Petri de 60 X 15 mm, con medio sólido PpNH<sub>4</sub> adicionado con las diferentes concentraciones de las hormonas vegetales en presencia o ausencia de Glc o el análogo fosforilable por HXK Manosa (Man) (Tabla 4). Cabe señalar que en los experimentos realizados con el musgo *P. replicatum* solo se utilizó la hormona ABA (Tabla 4 en negritas)

Tabla 4. Concentraciones de las tres fitohormonas en presencia o ausencia de Glc o su análogo fosforilable por HXK, Manosa.

Variables	Concentraciones	Combinaciones con Glc.	Combinaciones con Man.
Control negativo (PpNH <sub>4</sub> )			
BAP	0.1 μM	0.1 μM + Glc 30 mM	0.1 μM + Man 10 mM
	10 μM	10 μM + Glc 30mM	10 μM + Man 10 mM
<b>ABA</b>	<b>0.1 μM</b>	<b>0.1 μM + Glc 30 mM</b>	<b>0.1 μM + Man 10mM</b>
	<b>10 μM</b>	<b>10 μM + Glc 30 mM</b>	<b>10 μM + Man 10 mM</b>
IAA	5 μM	5 μM + Glc 30 mM	5 μM + Man 10 mM
	10 μM	10 μM + Glc 30 mM	10 μM + Man 10 mM
Control positivo Glc	30mM		
Control positivo Man	10 mM		

### Análisis fenotípico

El análisis fenotípico se realizó mediante la observación visual y un registro fotográfico que inició a partir del día en que las membranas estuvieron en contacto por primera vez con los diferentes tratamientos (día 0), seguido de los días 5, 15 y 30 del crecimiento

del musgo, esto para evidenciar cambios tempranos y tardíos en el fenotipo (CE, número y tamaño de gametóforos y apariencia fenotípica). Para tener una mejor calidad de las imágenes se utilizó una cámara Nikon D80 con una resolución de imagen de 300 dpi. Las fotografías fueron tomadas a la misma distancia en un estudio fotográfico construido y adecuado a las condiciones del laboratorio (Fig. 15). Para hacer un mejor acercamiento del tejido protonemal o resaltar alguna característica importante se realizaron también fotografías haciendo uso de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ1500) acoplado a la cámara mencionada.

### **Determinación del crecimiento expansivo (CE)**

La determinación del crecimiento expansivo de los protonemas del musgo se realizó utilizando el programa AutoCAD (2014) el cual posee una herramienta de medición que permite determinar la medida exacta de la imagen a analizar (diámetro del musgo en milímetros a partir del registro fotográfico) ya que dicha herramienta calcula la distancia entre varios puntos.

### **Conteo de Gametóforos**

Para determinar el número de gametóforos formados durante los 30 días de desarrollo del musgo, se realizó la cuantificación de estos. Considerando como “gametóforo” a los brotes que poseían al menos dos filidios bien formados. Se colocó la caja Petri abierta en el microscopio estereoscópico y con ayuda de una pinza se retiraron cuidadosamente cada uno de los gametóforos. Para evitar la deshidratación o estrés en los gametóforos, éstos fueron colocados en una caja de Petri adicionada con medio PpNH<sub>4</sub>.

Finalizado el conteo, se tomaron fotografías para evidenciar el tamaño de tres gametóforos representativos de cada tratamiento al día 30 de desarrollo, para *P. patens* y al día 40 para *P. replicatum*.



Fig. 15. Estudio fotográfico que consta de una caja de cartón forrada con papel aluminio para reflejar la luz y obtener una mejor toma de la imagen, 2 focos de luz blanca de 23 W y un trípode para sostén de la cámara fotográfica.

### Determinación de eficiencia fotosintética (EF) en tratamientos de Glc y Stl

Para el análisis de este parámetro fisiológico, se determinó la EF mediante la relación inversa de la fluorescencia de clorofila medida por un fluorómetro digital (FluorPen FP 100-B, Photo Systems Instruments).

Las mediciones se realizaron los días 0, 5, 15 y 25 de exposición a los medios con Glc y Stl. Para evitar variaciones debidas a la regulación circadiana, las mediciones se realizaron a la misma hora del día (14:00 hrs). Cabe señalar que antes de iniciar con la medición de la EF, los tejidos se pre-adaptaron a oscuridad por 10 min.

### Análisis estadístico.

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 5.00) para hacer el análisis estadístico (ANOVA de una vía y prueba de Tukey) de los datos obtenidos.

## RESULTADOS

### Efecto de la Glc en protonemas de *P. replicatum*

Las observaciones fenotípicas demostraron que la Glc en concentraciones bajas (100 mM) tiene un efecto negativo en el desarrollo de *P. replicatum*, provocando disminución

significativa en el CE (Fig. 17). En contraste Stl 100 mM ocasiona un incremento significativo en el CE comparado con el control y Glc 100 mM. Otra característica observada fue que los protonemas sometidos a 100 mM de Glc presentaron pigmentación más oscura y en la periferia de la colonia se presentaron algunos tejidos cloróticos (Fig. 16), estas características se observaron desde los primeros días de desarrollo. Los resultados indican un efecto negativo de la Glc (100 mM) sobre el crecimiento de los protonemas de *P. replicatum*

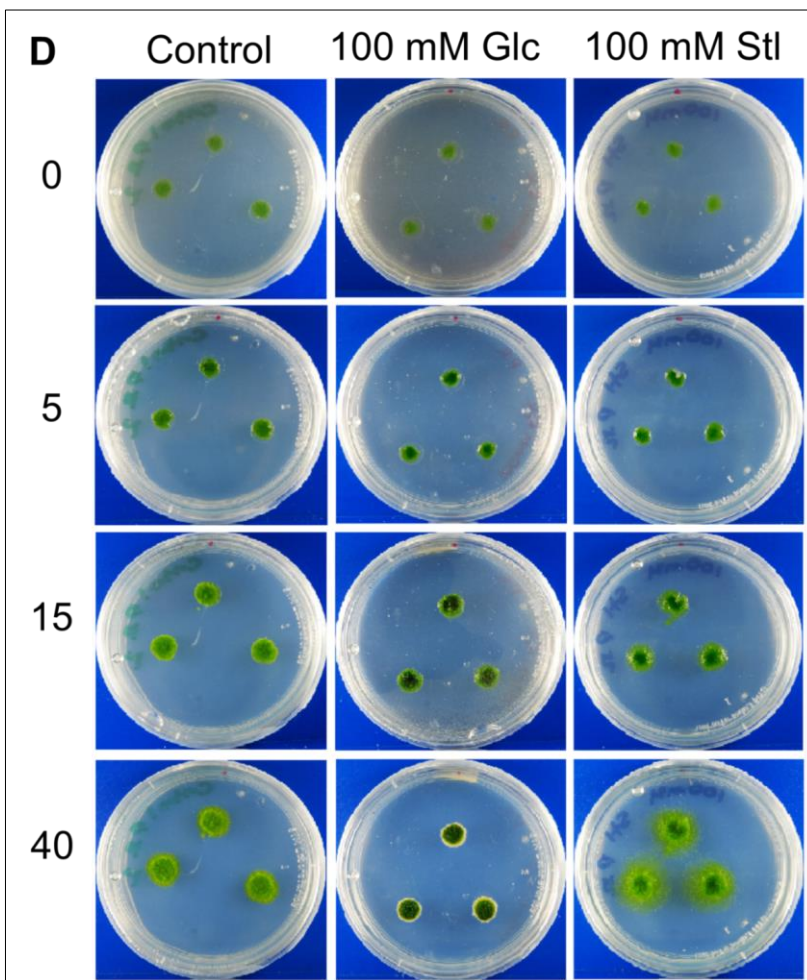


Fig. 16. Imagen panorámica representativa de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a concentraciones

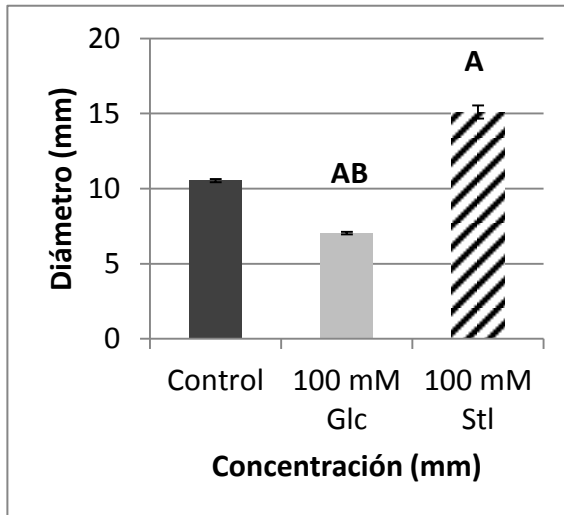


Fig. 17 CE de los protonemas de *P. replicatum* sometidos durante 40 días a concentraciones bajas de Glc. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=9$  (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control.  $p= 0.05$

En cuanto a los protonemas sometidos a altas concentraciones de Glc (300 y 500 mM) se observó una disminución significativa en el CE de los protonemas en Glc 300 mM así como en el control isosmótico (300 mM Stl) (Figs. 18 y 19). Los protonemas sometidos a Glc 300 mM presentaron aclaramiento en algunos tejidos en contraste con la condición isosmótica (300 mM Stl), en donde la coloración de los protonemas se observaron similares al control. El CE de los tejidos protonemales sometidos a Glc y Stl 500 mM se redujo significativamente al igual que en presencia de Glc y Stl 300 mM. Por otro lado, Glc 500 mM indujo un obscurecimiento de los tejidos comparado con el control y la condición isosmótica, en donde los tejidos se observaron verde claro (Fig. 18).

A pesar que los protonemas en Glc 300 y 500 mM presentaron mayor disminución en el CE, no se encontraron diferencias significativas entre dichas concentraciones y las condiciones osmóticas. Con base en estos resultados se concluye que la disminución en el CE así como los cambios en la coloración de los protonemas de *P. replicatum* se le atribuyen a un efecto causado preponderantemente por la Glc en concentraciones altas.

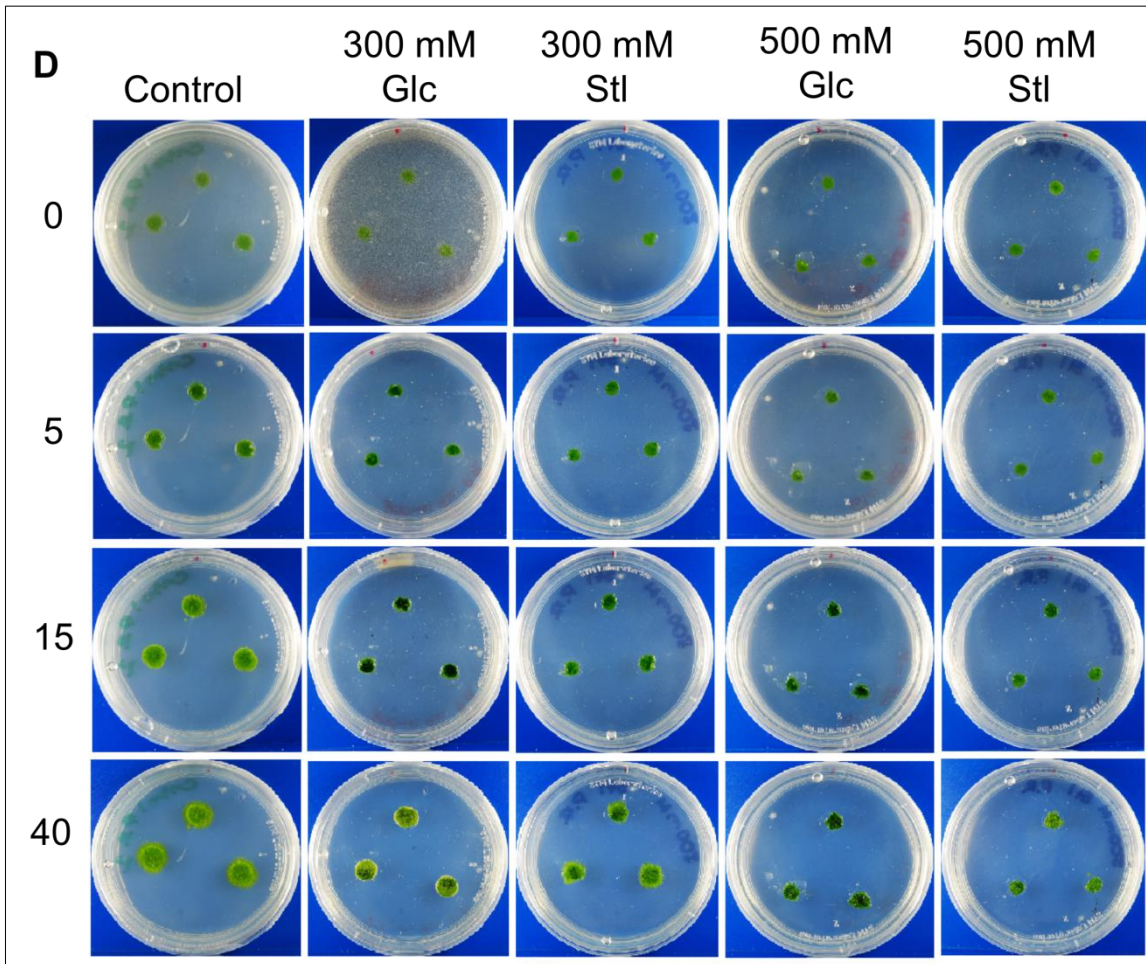


Fig. 18. Imagen panorámica representativa de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a concentraciones altas de Glc (300 y 500 mM) durante 40 días. D= días.

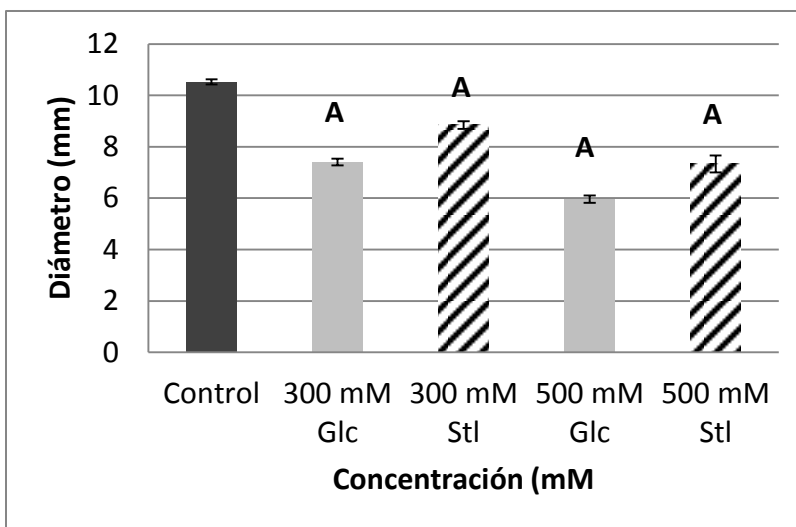


Fig. 19. CE de los protonemas de *P. replicatum* sometidos durante 40 días a concentraciones altas de Glc. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=9$  (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control.  $p=0.05$

Por otro lado, la Glc en concentraciones muy altas tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento y desarrollo del musgo *P. replicatum*, ya que se observó una inhibición significativa en el CE de los protonemas en concentraciones altas de Glc y Stl (700 y 1000 mM) (Fig. 21). Los tratamientos con Glc y Stl 700 mM se caracterizaron por presentar obscurecimiento del tejido protonemal. En contraste, los tejidos tratados con Glc y Stl 1000 mM presentaron fenotipos cloróticos (Fig. 20). Cabe mencionar que Glc 700 mM asevera la inhibición en el CE.

Estos resultados nos llevan a concluir que los fenotipos observados (inhibición en el CE y cambios en la coloración) se deben un efecto osmótico, sin embargo concentraciones de Glc 700 mM aseveran dicha disminución en el CE en protonemas de *P. replicatum*.

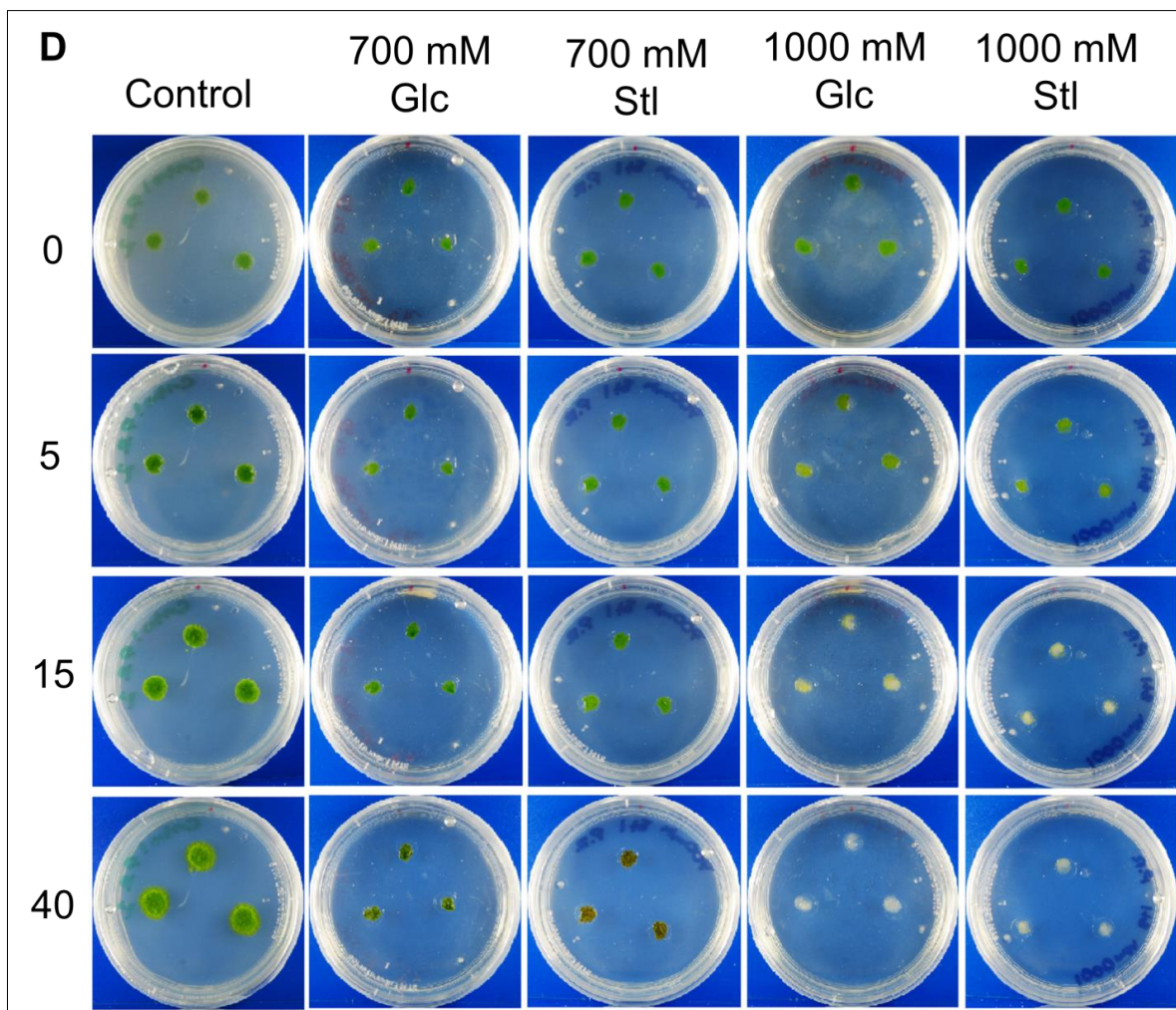


Fig. 20. Imagen panorámica representativa de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a concentraciones muy altas de Glc (700 mM y 1000 mM) durante 40 días. D= días.

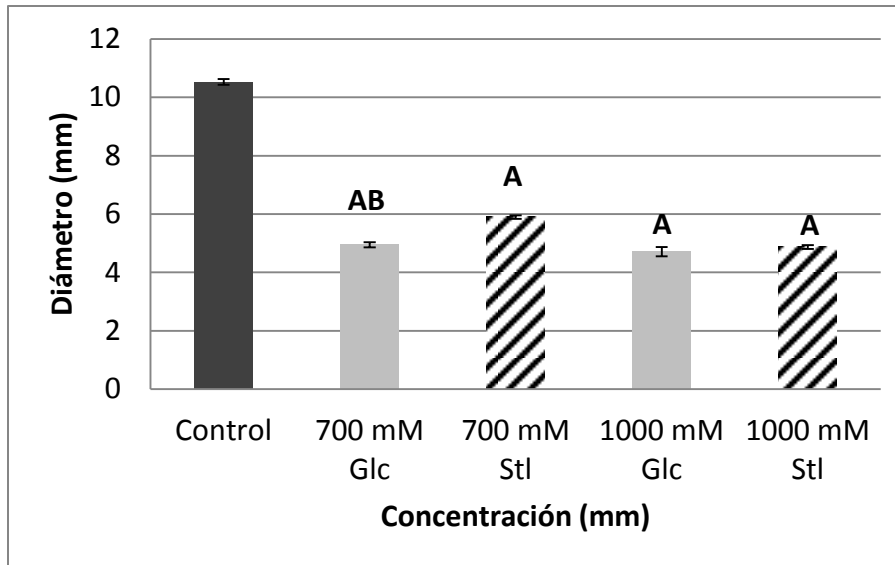


Fig. 21. CE de los protonemas de *P. replicatum* sometidos durante 40 días a concentraciones muy altas de Glc. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=9$  (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas respecto al control iso-osmótico.  $p= 0.05$

### Efecto de la Glc a concentraciones bajas sobre la EF

Para cumplir con el objetivo número dos acerca de la EF (parámetro fisiológico) en *P. replicatum* en respuesta a diferentes concentraciones de Glc, se cuantificó este parámetro en 5 momentos distintos. A pesar de que se observó una disminución en la EF al día 5 en los protonemas en Glc 100 mM, esta no fue significativa. Por otro lado, al día 15 de desarrollo, los protonemas en Glc 100 mM tuvieron un comportamiento similar al control y la condición osmótica redujo la EF significativamente (Fig. 22). Ya que no hubo diferencias significativas en el rendimiento cuántico de los tejidos entre 100 mM de Glc y la condición osmótica al día 25 de desarrollo del musgo, se concluyó que el efecto negativo en EF de *P. replicatum* en concentraciones bajas (100 mM) se debe un efecto predominantemente osmótico.

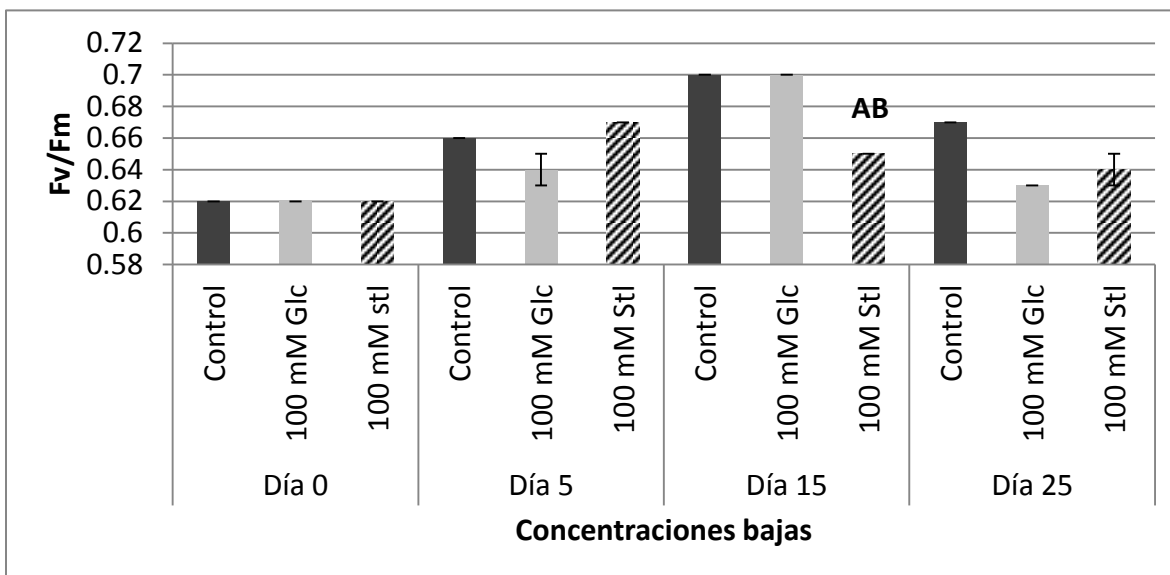
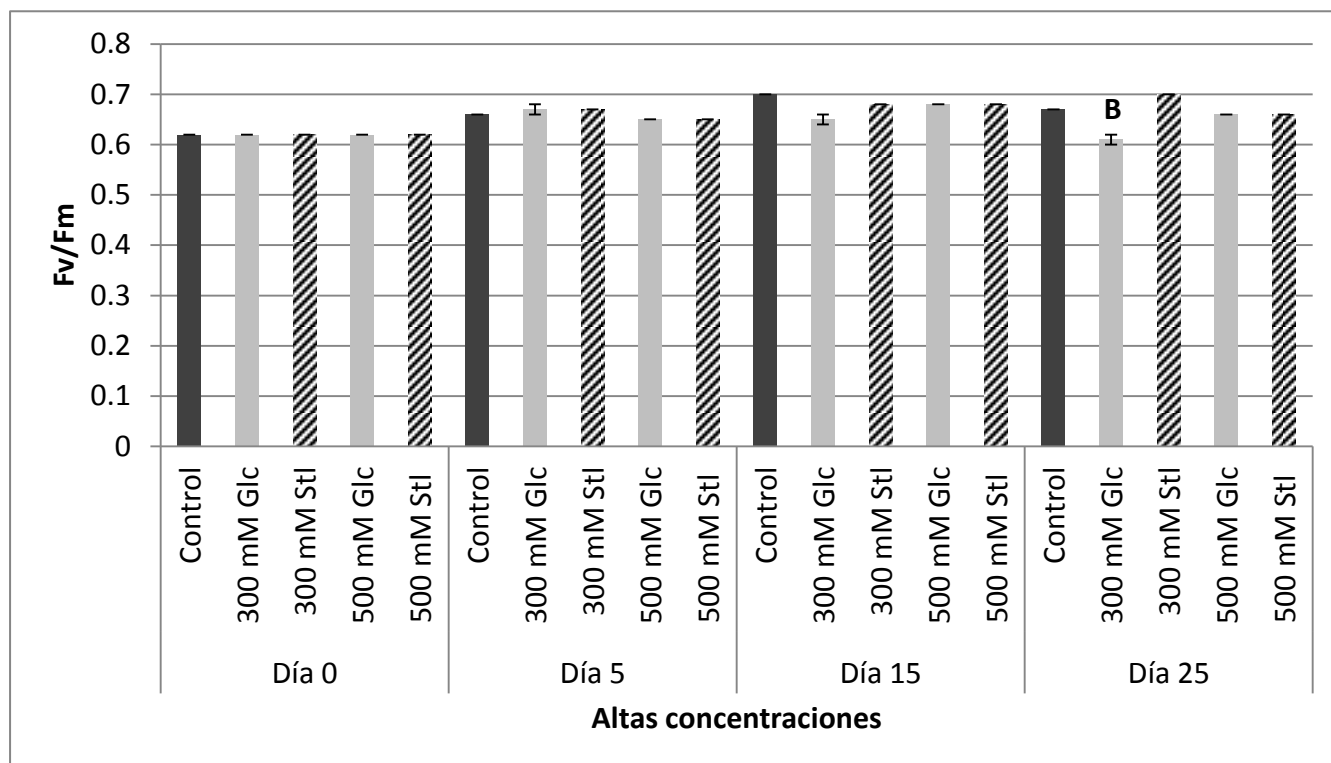


Fig. 22. EF de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a concentraciones bajas de Glc durante 25 días. Se representa la  $\bar{x} \pm$  ES, n=9 (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control B: Diferencias significativas respecto al control iso-osmótico.  $p=0.05$

### Efecto de la Glc a concentraciones altas sobre la EF

La EF de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a Glc 300 mM se observó similar al control durante los primeros días de desarrollo, sin embargo, al día 25 se observó una disminución significativa en la EF en 300 mM de Glc de *P. replicatum* respecto a Stl 300 mM (Fig. 23). Con base en las observaciones se concluyó que la Glc en concentraciones altas (300 mM) posee un efecto negativo sobre la EF de *P. replicatum*.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento cuántico entre el control y 500 mM de Glc y Stl, por lo que no se logró distinguir los efectos de la Glc y del Stl en concentraciones altas sobre la EF de *P. replicatum*.



### Efecto de la Glc a concentraciones muy altas sobre la EF

Al día 5 disminuyó la EF de los protonemas sometidos a 700 mM de Glc, esta disminución es significativamente diferenciable del efecto osmótico. Por otro lado, al día 15, decayó significativamente la EF de los protonemas sometidos a Glc y Stl 700 mM comparado con el control, pero el efecto no fue diferenciable entre Glc y Stl 700 mM; sin embargo, al día 25 el efecto negativo en la EF de *P. replicatum* fue significativamente más severo en 700 mM Stl.

Los protonemas sometidos a Glc y Stl 1000 mM presentaron una disminución significativa en la EF desde el día 5, este efecto fue más severo en Glc 1000 mM. Sin embargo, a los días 15 y 25, el efecto negativo en la EF de los protonemas en Glc 1000 mM no fue diferenciable de la condición osmótica (Stl 1000 mM), ya que ambas concentraciones tuvieron efectos muy similares entre sí (Fig. 24).

De estos resultados se concluye que existe un efecto negativo de la Glc en la EF muy claro en los primeros 5 días de tratamientos con concentraciones muy altas (700 y 1000

mM), posteriormente la disminución en la EF de los protonemas de *P. replicatum* se debe a un efecto predominantemente osmótico.

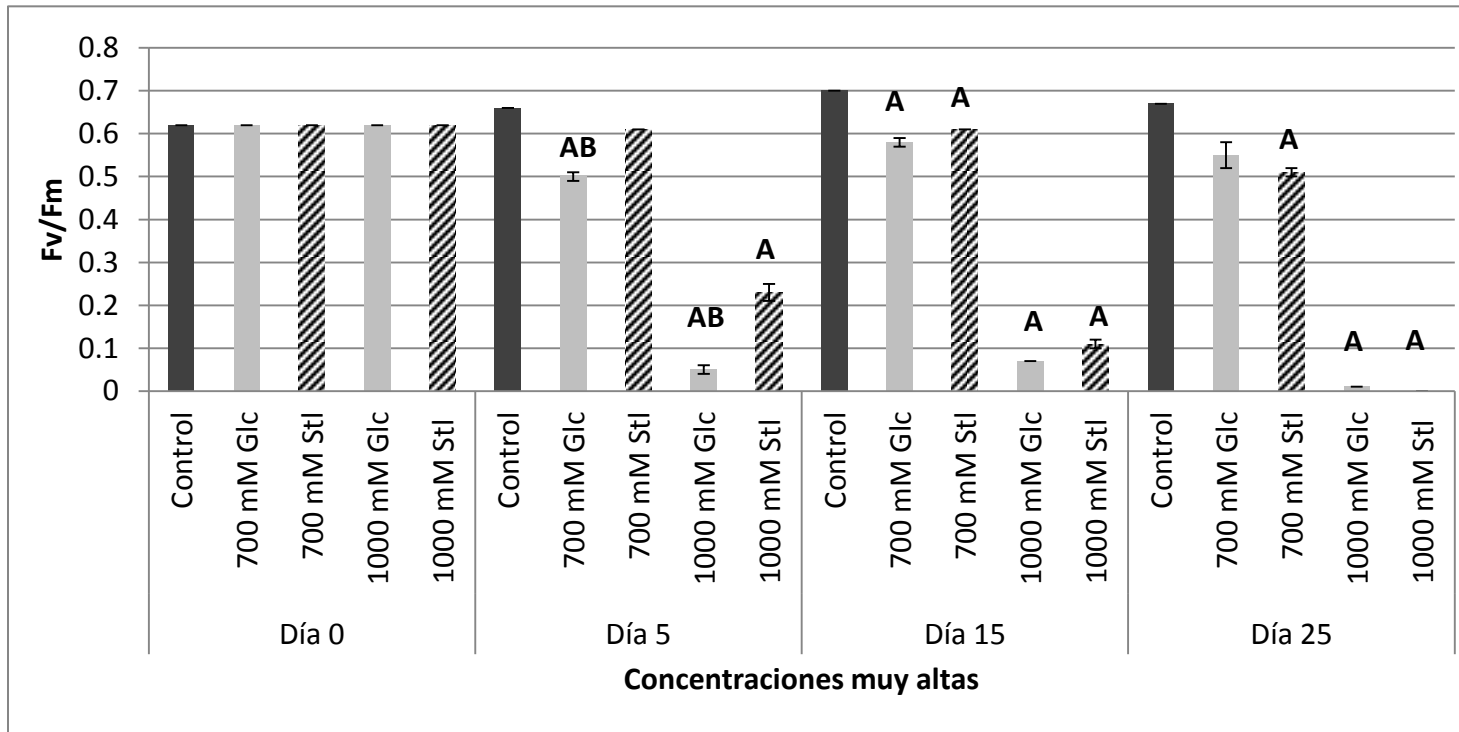


Fig. 24. EF de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a concentraciones muy altas de Glc durante 25 días. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=9 (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control, B: Diferencias significativas respecto al control iso-osmótico. p=0.05

### Evaluación de las vías de señalización de Glc dependientes de HXK (Man) e independientes de metabolismo en el fenotipo de *P. replicatum*

Los protonemas sometidos a Glc 30 mM presentaron obscurecimiento al centro de la colonia así como clorosis en la periferia (Fig. 25). Estos cambios en la coloración se acompañaron de una disminución significativa en el CE (fig. 26). En contraste, los protonemas sometidos a Man 10 mM presentaron un comportamiento similar al control en la coloración y en el CE del musgo. Los resultados evidencian un efecto negativo de la Glc en la pigmentación y el CE de *P. replicatum*, por una vía dependiente de HXK y de metabolismo.

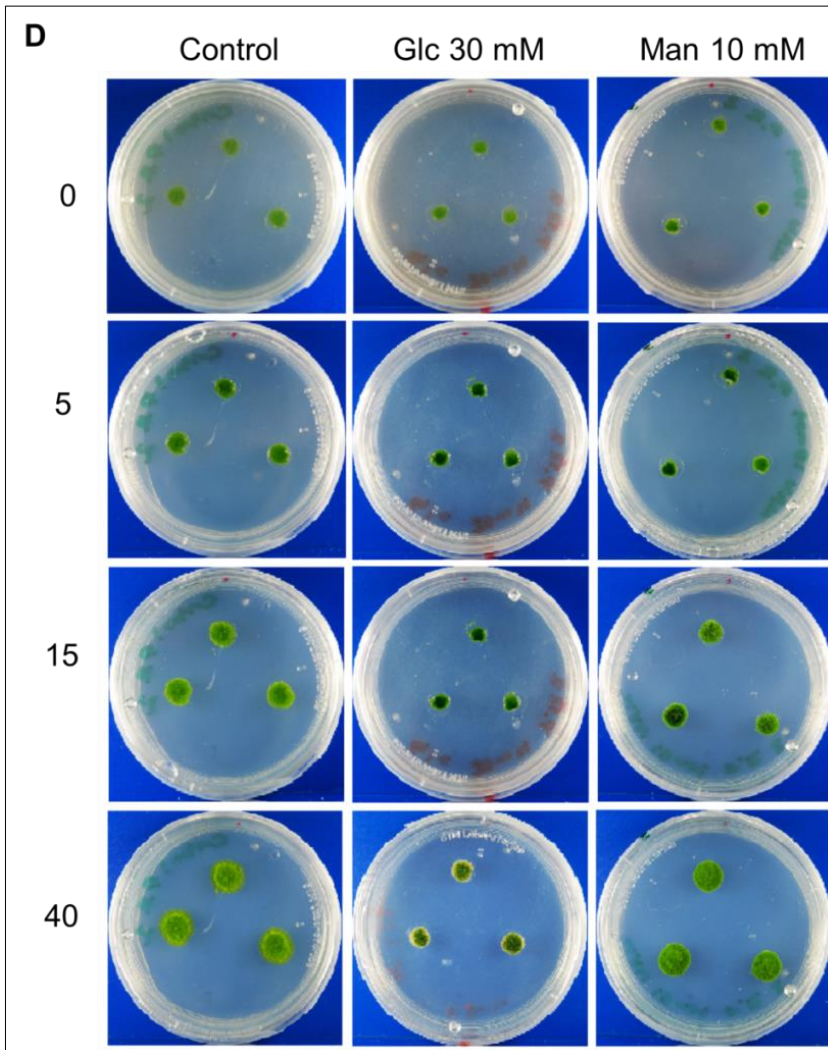


Fig. 25. Desarrollo de protonemas de *P. replicatum* sometidos a 30 mM de Glc y Man 10 mM durante 40 días.

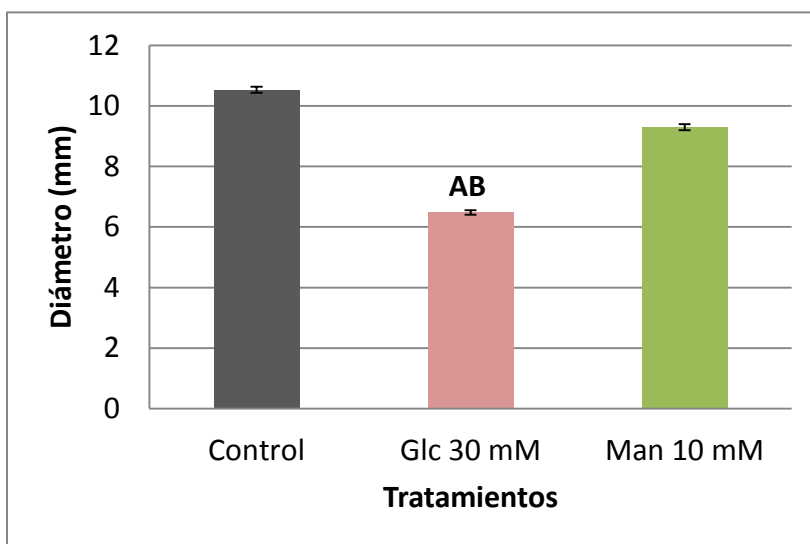


Fig. 26. CE al día 40 de desarrollo de *P. replicatum* sometido a Glc 30 mM y Man 10 mM. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=9$  (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencia significativa respecto al control. B: Diferencias significativas respecto a otro azúcar.  $p=0.05$

## Evaluación del efecto de la Glc o su análogo (Man) dependiente de HXK, en presencia de fitohormonas, en el desarrollo de *P. patens*

Como primer abordaje se utilizó el musgo modelo *P. patens*, ya que existen reportes del efecto de diferentes fitohormonas en algunos aspectos de desarrollo y expresión génica en esta especie. Las fitohormonas y concentraciones seleccionadas fueron con base a reportes previos:

- ABA y BAP 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  (Thealander *et al.*, 2005).
- GA<sub>3</sub> 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  (Yasumura Yuki *et al.*, 2007)

Además, se empleó la auxina IAA en concentraciones 1,5 y 10  $\mu\text{M}$  como lo mencionan Thealander *et al.* (2005). Los experimentos en *P. patens* se realizaron para determinar el efecto de 4 fitohormonas en el desarrollo del musgo bajo nuestras condiciones experimentales, y así poder seleccionar la(s) hormona(s) a utilizar en los experimentos posteriores de evaluación de interacción de las vías de señalización hormonal y de azúcares en *P. replicatum* (Anexo 2). Con base en los resultados de los experimentos 1 y 2 con fitohormonas (Anexos 2 y 3) se realizó un tercer experimento en el cual se utilizaron las hormonas BAP, ABA e IAA a diferentes concentraciones adicionadas con Glc 30 mM y su análogo Man 10 mM para observar la posible interacción de las vías de respuesta a Glc-fitohormonas y la posible participación de vías dependientes de HXK y/o del metabolismo de la Glc. La giberelina GA<sub>3</sub> no se incluyó en este tercer experimento ya que los resultados anteriores en la concentración 10  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> no fueron tan contrastantes con la condición control. Las concentraciones de Glc y Man se seleccionaron de acuerdo a Moreno Velázquez (2013).

Los tratamientos con ABA 0.1 y 10  $\mu\text{M}$  demostraron reproducibilidad con los experimentos realizados anteriormente (Anexos 1 y 2), reiterando que el ABA tiene un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de *P. patens* provocando disminución significativa en el CE (Fig. 27) así como en el número de gametóforos (Fig. 29).

En los protonemas sometidos a ABA (0.1 y 10  $\mu\text{M}$ ) adicionadas con Glc 30 mM se observó que concentraciones bajas de ABA (0.1  $\mu\text{M}$ ) + Glc 30 mM provocan un aumento significativo en el CE comparado con el control negativo (PpNH<sub>4</sub>), es decir se

potenció el CE de los protonemas sometidos a ABA 0.1  $\mu$ M + Glc 30 mM. (Figs. 27 y 28). Además el tamaño y el número de los gametóforos aumentó significativamente (Figs. 29 y 30). En contraste, el CE disminuyó significativamente en ABA 10  $\mu$ M + Glc 30 mM, dicha disminución resultó más severa que los protonemas en los tratamientos con ABA 10  $\mu$ M. La formación de gametóforos fue abatida en ABA 10  $\mu$ M + Glc 30 mM. Por lo tanto estos tratamientos evidenciaron una clara intercomunicación de las vías de señalización activadas por Glc y ABA en briofitas.

En los tratamientos adicionados con Man 10 mM, los tejidos protonemales de *P. patens* mostraron un comportamiento similar a lo observado con Glc, es decir CE mayor en concentraciones bajas de ABA adicionadas con Man (ABA 0.1 $\mu$ M + Man 10 mM) así como incremento en el número y tamaño de gametóforos; e inhibición del crecimiento y desarrollo en concentraciones altas de ABA con Man (ABA 10  $\mu$ M + Man 10 mM) Cabe señalar que el mayor número de gametóforos se observó en los tratamientos adicionados con este análogo de Glc (Man 10 mM) (Fig. 29). Ya que la Man es un análogo dependiente de HXK e independiente de metabolismo (Loreti *et al.*, 2001), se concluye que este efecto del azúcar es por una vía dependiente de HXK pero independiente de metabolismo. Estos tratamientos nos permiten concluir que la intercomunicación de las vías de señalización de Glc y ABA son dependientes de HXK e independientes del metabolismo en *P. patens*.

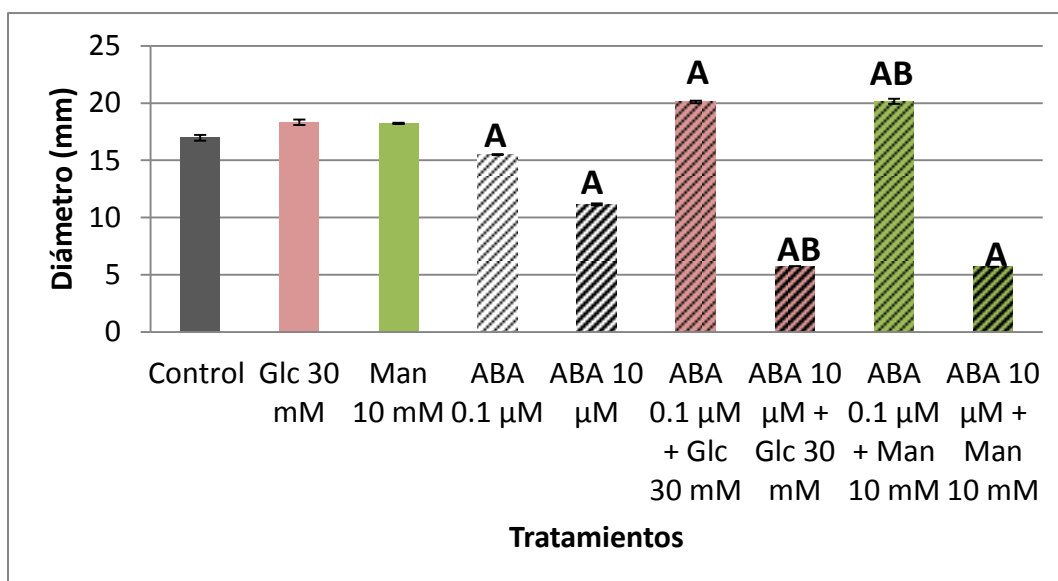


Fig. 27. CE de los protonemas sometidos a los tratamientos relacionados con la interacción de las vías azúcares - ABA en *P. patens*. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas). A: Diferencia significativa respecto al control, B: Diferencia significativa respecto a correspondiente azúcar sola.

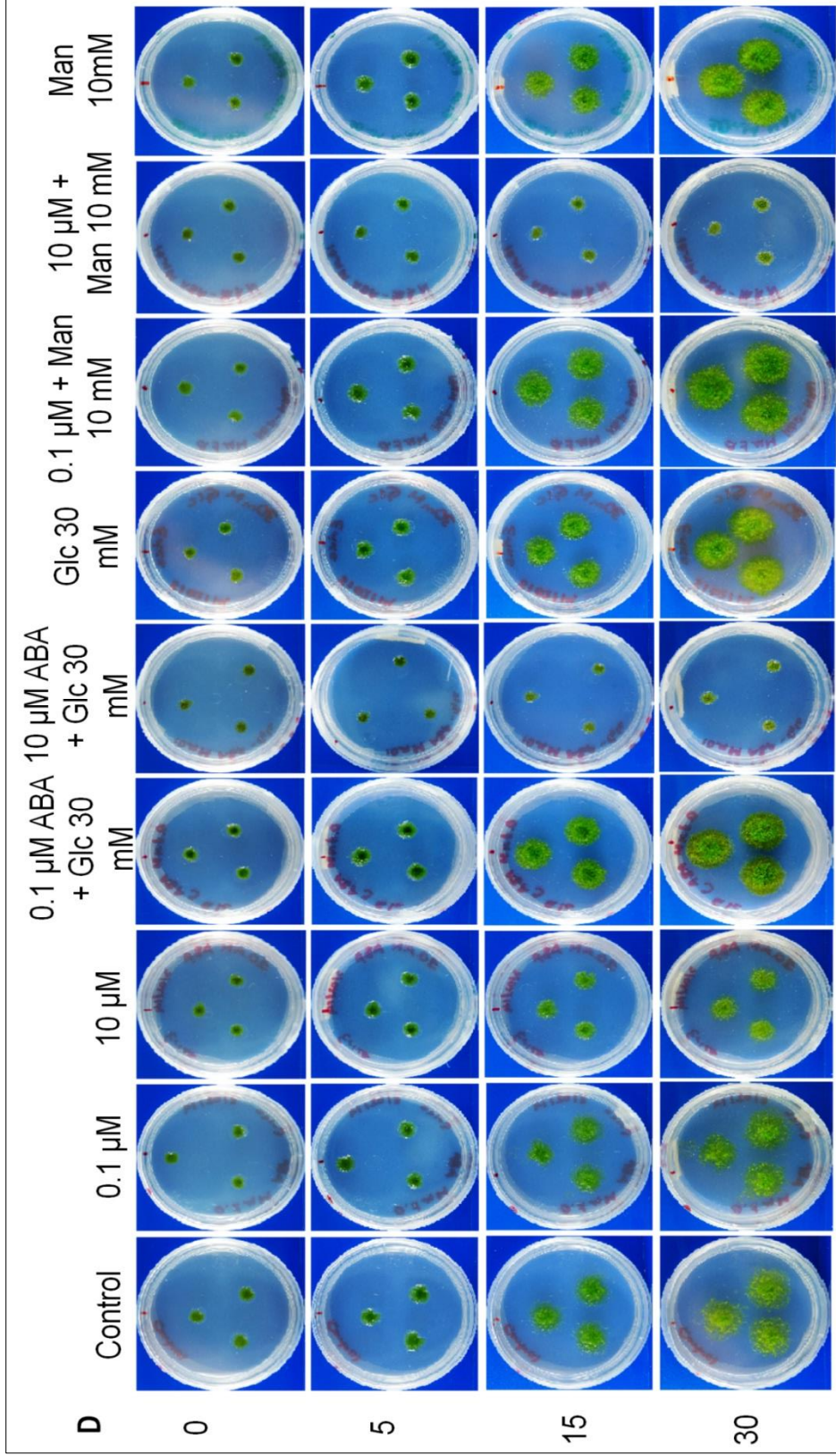


Fig. 28. Registro fotográfico del desarrollo de protonemas de *P. patens* sometidos a diferentes tratamientos de interacción Glc/Man-ABA durante 30 días.

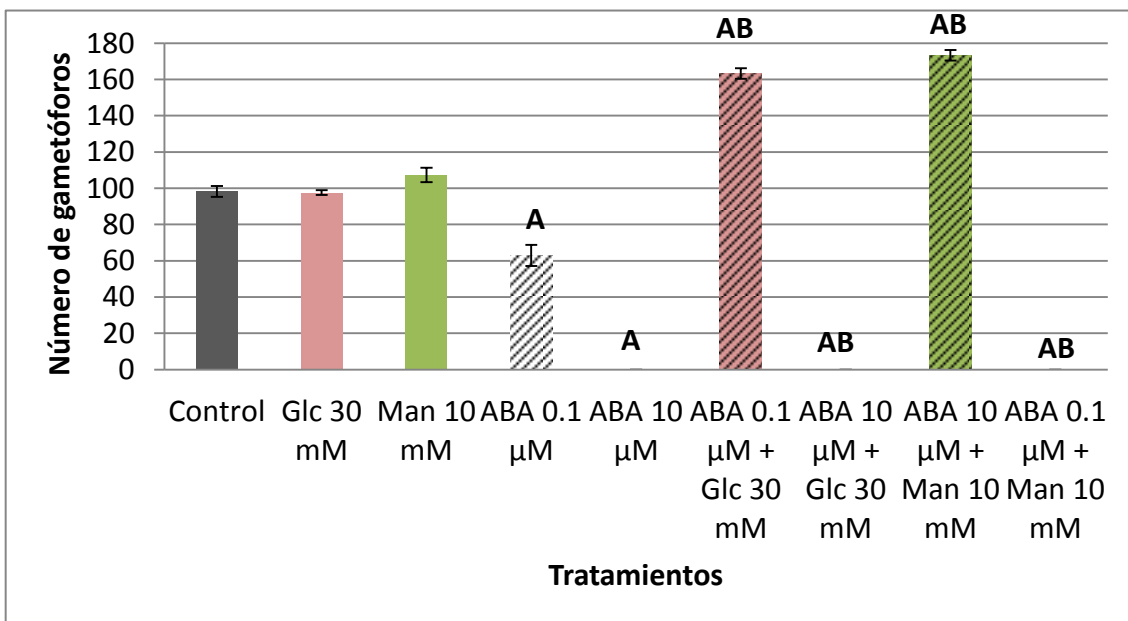


Fig. 29. Número de gametóforos obtenidos al día 30 de exposición a los tratamientos adicionados con ABA y Glc/Man-ABA. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=6$  (membranas). A: Diferencia significativa respecto al control, B: Diferencia significativa respecto a correspondiente azúcar sola.

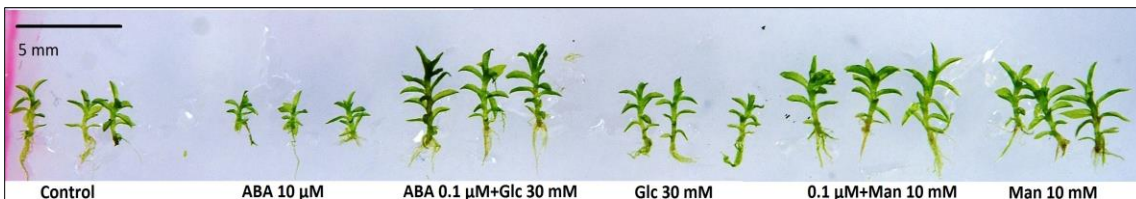


Fig. 30. Fotografía panorámica representativa que muestra 3 gametóforos representativos de cada tratamiento adicionados con ABA y Glc/Man-ABA. Control (negativo), Glc 30 mM (control positivo), Man 10 mM (control positivo).

Los protonemas sometidos al pre-tratamiento con BAP 10  $\mu\text{M}$  presentaron una reducción significativa en el CE, en contraste los tejidos tratados con BAP 0.1  $\mu\text{M}$  se comportaron semejantes al control. Por otro lado, el número de gametóforos disminuyó significativamente en ambas concentraciones de BAP (0.1 y 10  $\mu\text{M}$ ) en comparación con el control. Además, los protonemas sometidos a BAP 0.1  $\mu\text{M}$  presentaron gametóforos de menor tamaño a los de la condición control (Fig. 33).

Los protonemas de *P. patens* en tratamientos adicionados con BAP y Glc (BAP 0.1  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM y BAP 10  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM) no mostraron diferencias drásticas en el CE, ya que el comportamiento del tejido vegetal en estos tratamientos fue muy parecido a

los controles tanto positivo (Glc 30 mM) como negativo (PpNH<sub>4</sub>) (Figs. 31 y 34). Cabe mencionar que los protonemas en BAP 10 μM + Glc 30 mM sí mostraron reducción significativa en el CE comparados con los sometidos a BAP 10 μM + Man 10 mM. El número de gametóforos disminuyó significativamente en ambas concentraciones de BAP adicionadas con Glc (BAP 0.1 μM + Glc 30 mM y BAP 10 μM + Glc 30 mM) comparado con el control negativo y positivo (Fig. 32). La reducción en el número de gametóforos de los tejidos en BAP 0.1 μM + Glc fue significativamente más severa que los tejidos en BAP 0.1 μM. Con base en estos resultados se concluyó que el efecto negativo de BAP 0.1 μM en el número de gametóforos se asevera en presencia de Glc 30 mM, lo que evidencia una intercomunicación entre la vía de Glc y BAP en P. patens.

A pesar de que se observó un incremento en el CE de los protonemas sometidos a BAP 0.1 μM + Man 10 mM y BAP 10 μM, estadísticamente estos tratamientos no mostraron diferencias significativas comparados con el control negativo y positivo. Por otro lado, el efecto negativo de BAP 0.1 y 10 μM en el número de gametóforos fue contrarrestado por la Man en protonemas sometidos a BAP 0.1 y 10 μM + Man. Nuevamente, la intercomunicación de vías Glc-Citocinina (BAP) evidenciada (aunque de forma moderada) también implica vías dependientes de HXK e independientes de metabolismo en P. patens.

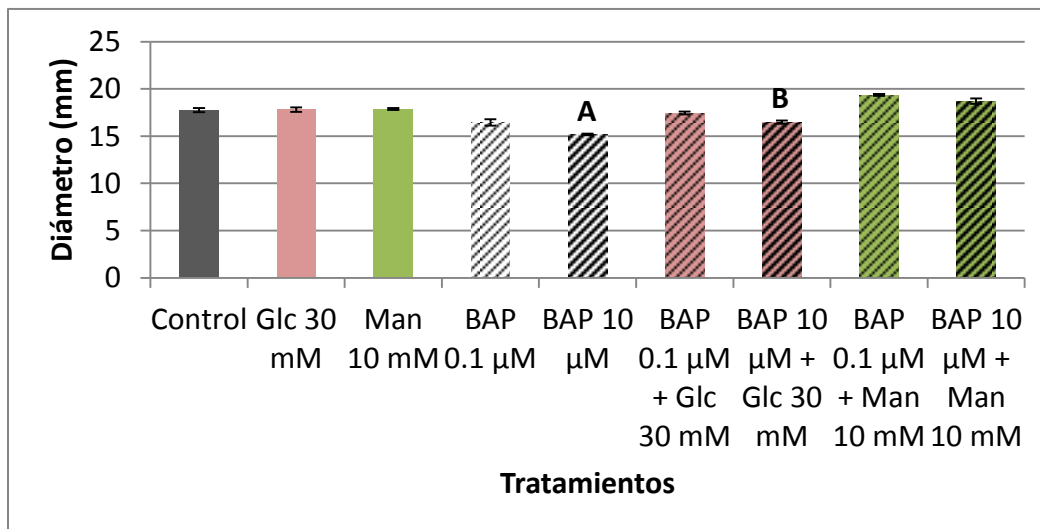


Fig. 31. CE de los protonemas de *P. patens* sometidos durante 30 días a los tratamientos relacionados con la interacción de las vías azúcares-BAP. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas). A: Diferencia significativa respecto al control. B: Diferencia significativa respecto a BAP 10 μM + Man 10 mM. p= 0.05

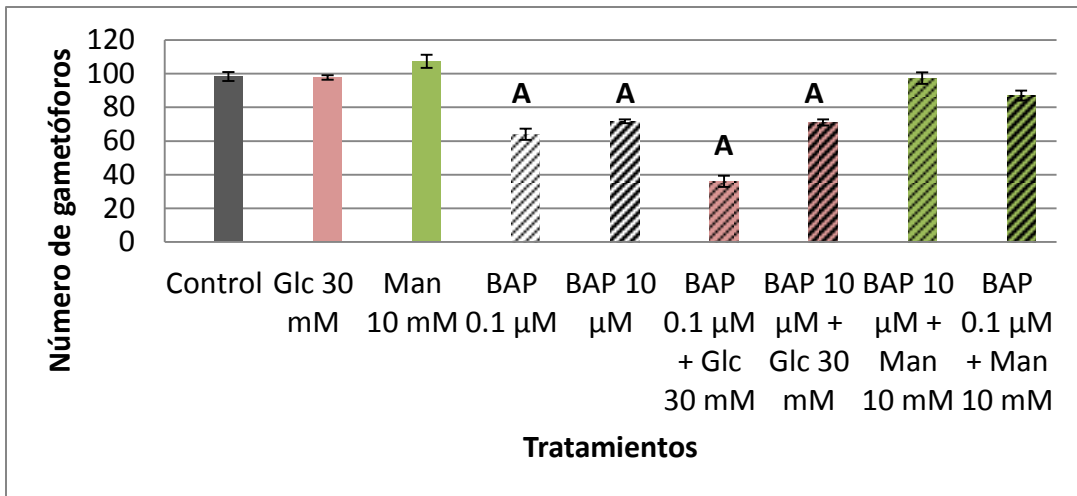


Fig. 32. Número de gametóforos de *P. patens* obtenidos al día 30 de exposición a los tratamientos adicionados con BAP y Glc/Man-BAP. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas). A: Diferencia respecto al control. B: Diferencia significativa respecto a correspondiente azúcar sola. C: Diferencia significativa respecto a correspondiente hormona sola.



Fig. 33. Fotografía panorámica que muestra 3 gametóforos de *P. patens* representativos de cada tratamiento con BAP y Glc/Man.

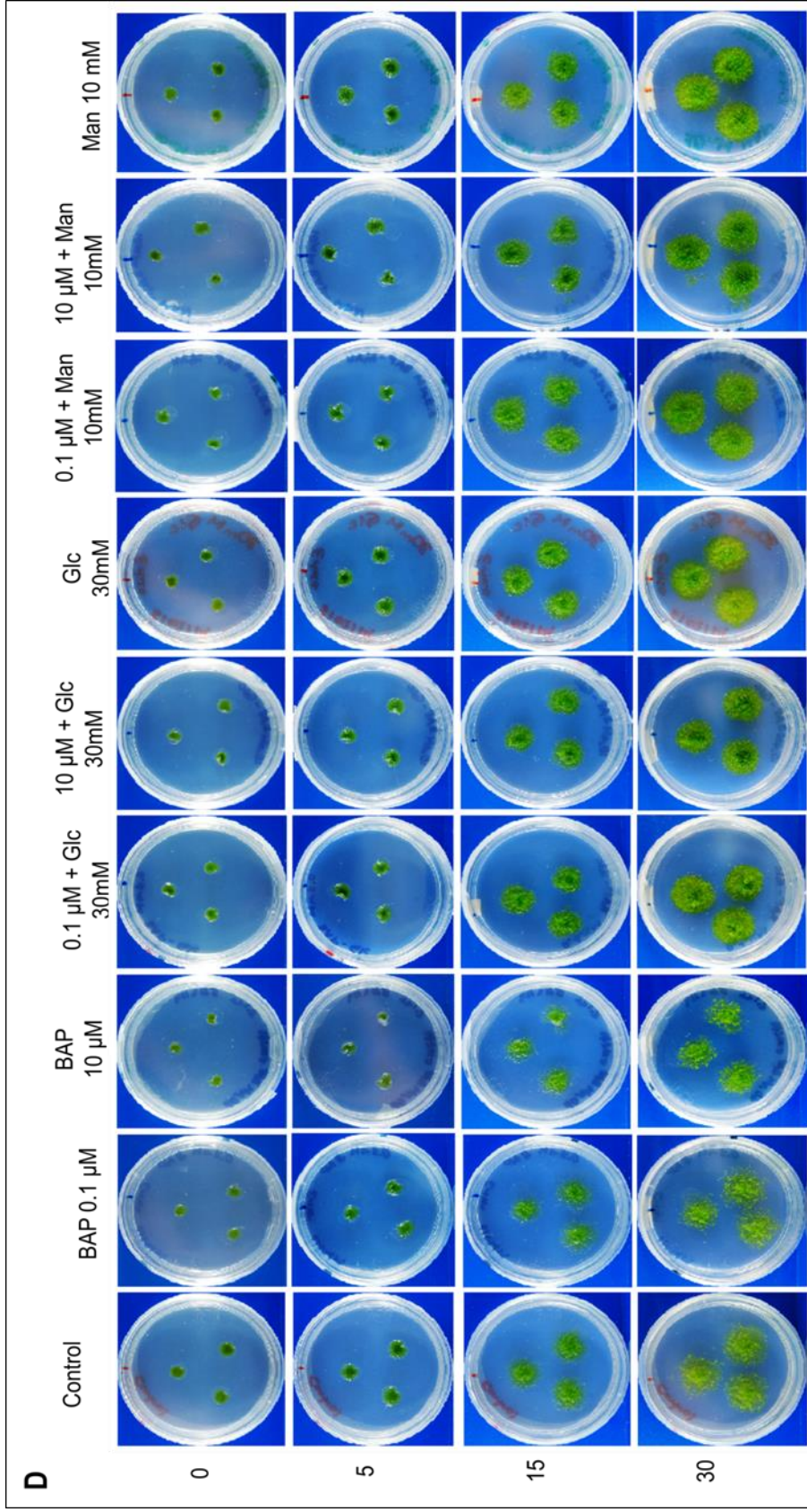


Fig. 34. Registro fotográfico del desarrollo de protonemas de *P. patens* sometidos a los tratamientos Glc/Man- BAP durante 30 días.

La auxina IAA a 5  $\mu\text{M}$  aumenta significativamente el CE de *P. patens* mientras que IAA 10  $\mu\text{M}$  presentó un crecimiento semejante al control (Figs. 35 y 38). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el número de gametóforos de los protonemas sometidos a IAA 5 y 10  $\mu\text{M}$  con el control (Fig. 36).

En adición, se observó un incremento significativo en el CE de los protonemas sometidos a IAA (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) + Glc 30 mM comparado con el control negativo (PpNH<sub>4</sub>) (Fig. 35). Así mismo, aumentó el número de gametóforos en los protonemas sometidos a IAA 10  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM, no obstante, estadísticamente este incremento no fue significativo. El tamaño de los gametóforos en IAA 5  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM y IAA 10  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM fue mayor comparado con el control (PpNH<sub>4</sub>) (Fig. 37).

Los tratamientos con 5  $\mu\text{M}$  IAA + Man 10 mM y 10  $\mu\text{M}$  + Man 10 mM produjeron un efecto en los tejidos similar a Glc 30 mM en cuanto al CE, se observó un aumento en el CE en ambas concentraciones de IAA + Man 10 mM, comparado con el control negativo y reducción significativa en el CE en contraste con Man 10 mM. Por otro lado el número de gametóforos fue menor en la concentración más baja de IAA (5  $\mu\text{M}$ ) con 10 mM Man (Fig. 36). En contraste, el tamaño de los gametóforos fue mayor al control positivo (Man 10 mM) y negativo (PpNH<sub>4</sub>). La concentración de IAA 10  $\mu\text{M}$  + Man 10 mM produjo un aumento en el número de gametóforos, mas no en el tamaño de los mismos, el cual fue menor al control positivo (Man 10 mM) (Fig. 37). En base a los resultados obtenidos se concluye que existe una posible intercomunicación de vías Glc-Auxina (IAA) en *P. patens* y que esta intercomunicación es por una vía dependiente HXK e independiente de metabolismo.

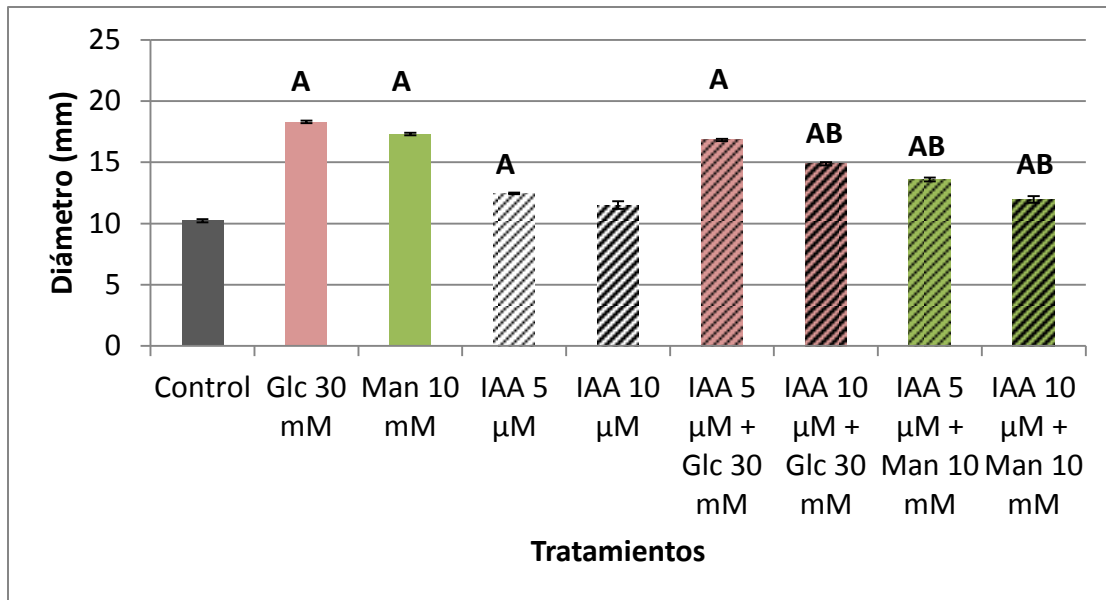


Fig. 35. CE de los protonemas de *P. patens* sometidos durante 30 días a los tratamientos relacionados con la interacción de las vías azúcares - IAA. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas). A: Diferencia significativa respecto al control. B: Diferencia significativa respecto a correspondiente azúcar solo. C: Diferencia significativa respecto a correspondiente hormona sola.  $p=0.05$

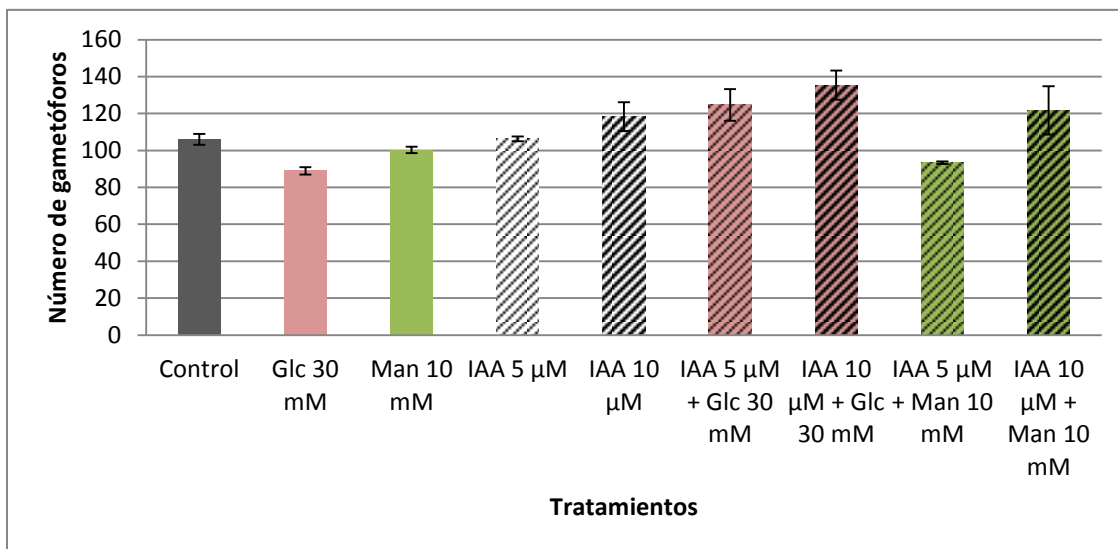


Fig. 36. Número de gametóforos de *P. patens* obtenidos al día 30 de exposición a los tratamientos adicionados con IAA y Glc/Man-IAA. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas).  $p=0.05$

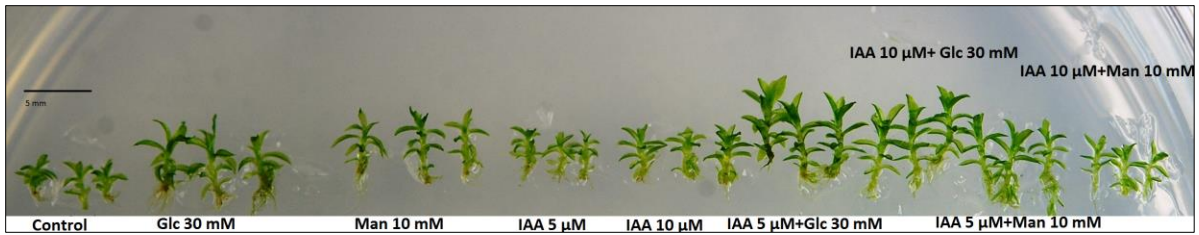


Fig. 37. Fotografía panorámica que muestra tres gametóforos de *P. patens* representativos de cada experimento con BAP y Glc/Man.

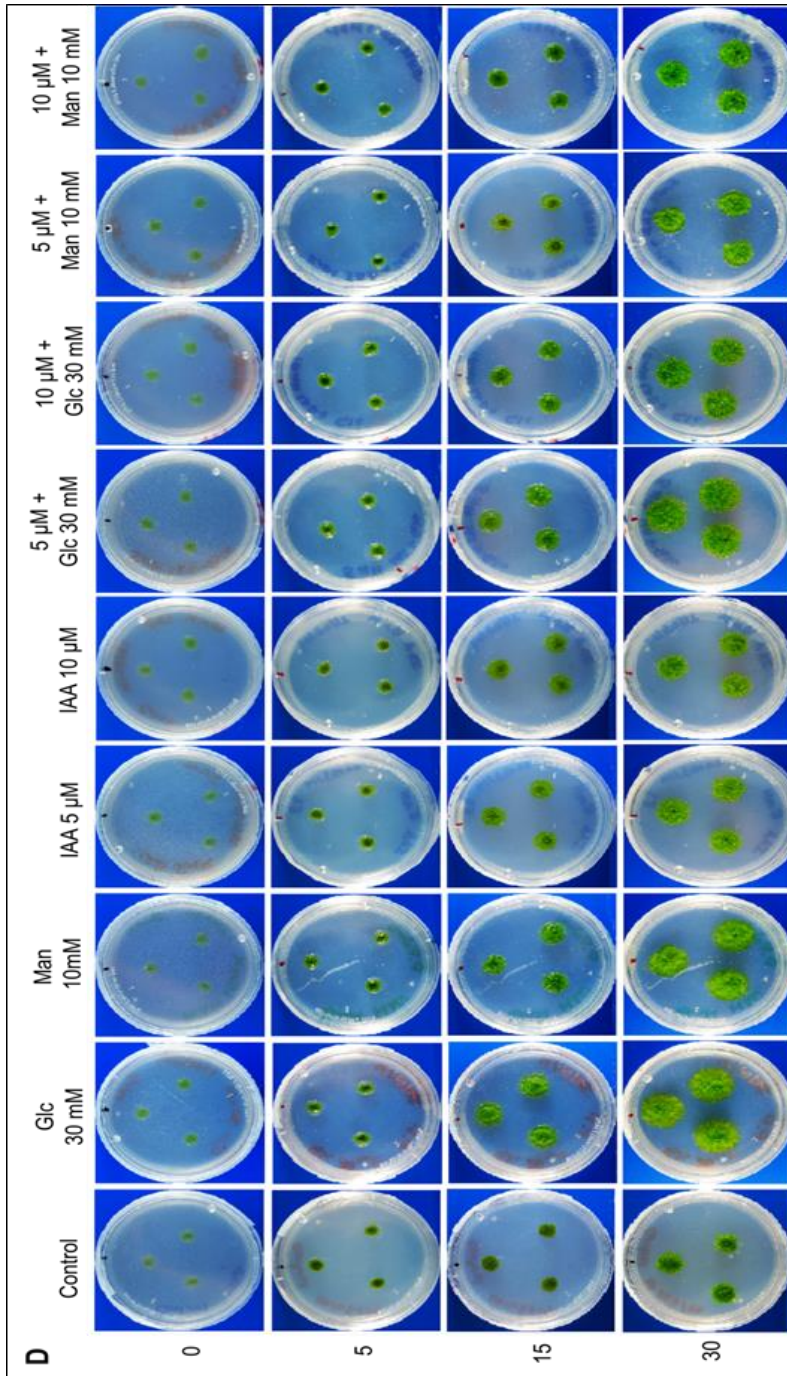


Fig. 38. Registro fotográfico del desarrollo de protonemas de *P. patens* sometidos a los tratamientos Glc/Man- IAA durante 30 días.

## Evaluación del efecto de la Glc o su análogo (Man) dependiente de HXK, en presencia de ABA, en el desarrollo de *P. replicatum*

Los protonemas sometidos a ABA 0.1 y 10  $\mu\text{M}$  presentaron un comportamiento semejante al control en cuanto al CE (Fig. 39), lo que contrasta con los resultados en el musgo *P. patens* en el que las mismas concentraciones de ABA (0.1 y 10  $\mu\text{M}$ ) reducen significativamente el CE. Por otro lado, los tejidos de *P. replicatum* sometidos a ABA 0.1  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM se caracterizaron por presentar una pigmentación más oscura y algunos tejidos blanquecinos en la periferia de la colonia. Además el CE de dichos protonemas disminuyó significativamente en comparación con el control negativo (PpNH<sub>4</sub>) (Fig. 39). Los protonemas en condiciones de ABA 10  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM presentaron una pigmentación ligeramente más opaca que el control, y el CE fue significativamente mayor que Glc 30 mM.

Los fenotipos observados en *P. replicatum* se diferencian de los resultados en *P. patens* ya que los protonemas en ABA 0.1  $\mu\text{M}$  adicionada con Glc 30 mM provocaron un aumento significativo el CE, mientras que ABA 10  $\mu\text{M}$  adicionados con Glc 30 mM provocaron un fenotipo de crecimiento arrestado que se reflejó en la disminución significativa en el CE de *P. patens*.

Los tejidos protonemales en condiciones de ABA 0.1  $\mu\text{M}$  + Man 10 mM presentaron reducción significativa en el CE en comparación con Man 10 mM y el control negativo (PpNH<sub>4</sub>). Además, este efecto en la reducción del CE de *P. replicatum* se observó acompañado de obscurecimiento de tejidos centrales y ligero aclaramiento de tejidos de la periferia (Fig. 40), comportamiento que también observamos en los protonemas en ABA 0.1 + Glc 30 mM. Los tejidos en ABA 10  $\mu\text{M}$  + Man 10 mM presentaron una pigmentación ligeramente más opaca y el CE fue similar al control positivo (Man 10 mM).

Con base en estas observaciones fenotípicas se concluye que los protonemas de *P. replicatum* sometidos a ABA 0.1  $\mu\text{M}$  + Man 10 mM evidenciaron una intercomunicación entre las vías de señalización de la Glc y las vías de señalización de la hormona ABA, ya que el efecto positivo de ABA 0.1  $\mu\text{M}$  y el efecto positivo de Man 10 mM aseveran la

disminución en el CE de los protonemas. Así mismo la vía de señalización activada ocurre a través de un vía dependiente de HXK e independiente de metabolismo en esta especie.

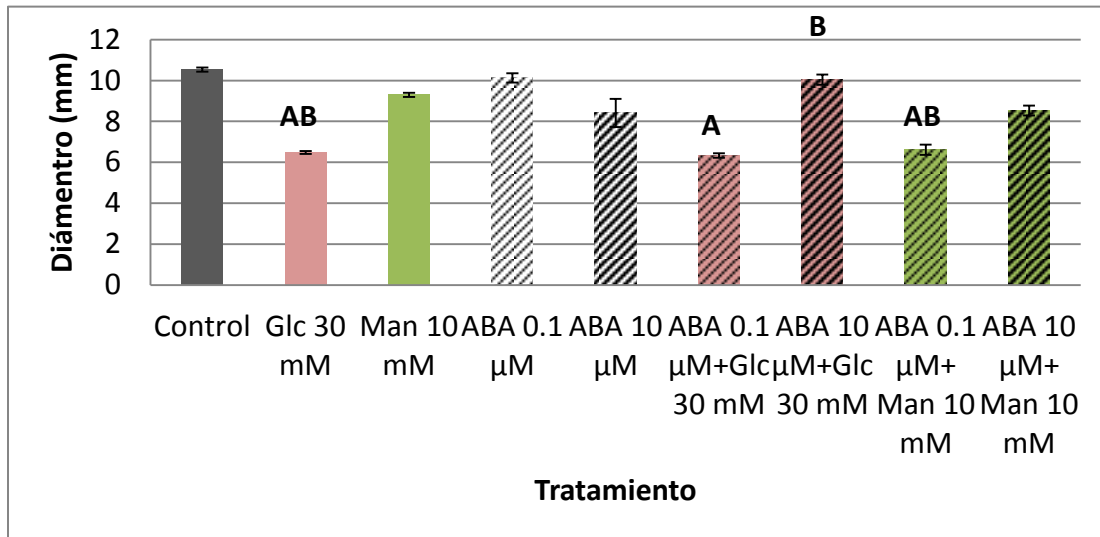


Fig. 39. CE al día 40 de desarrollo de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a los tratamientos con ABA y su interacción Glc/Man. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=9$  (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control, B: Diferencias significativas respecto a correspondiente azúcar sola.  $p= 0.05$

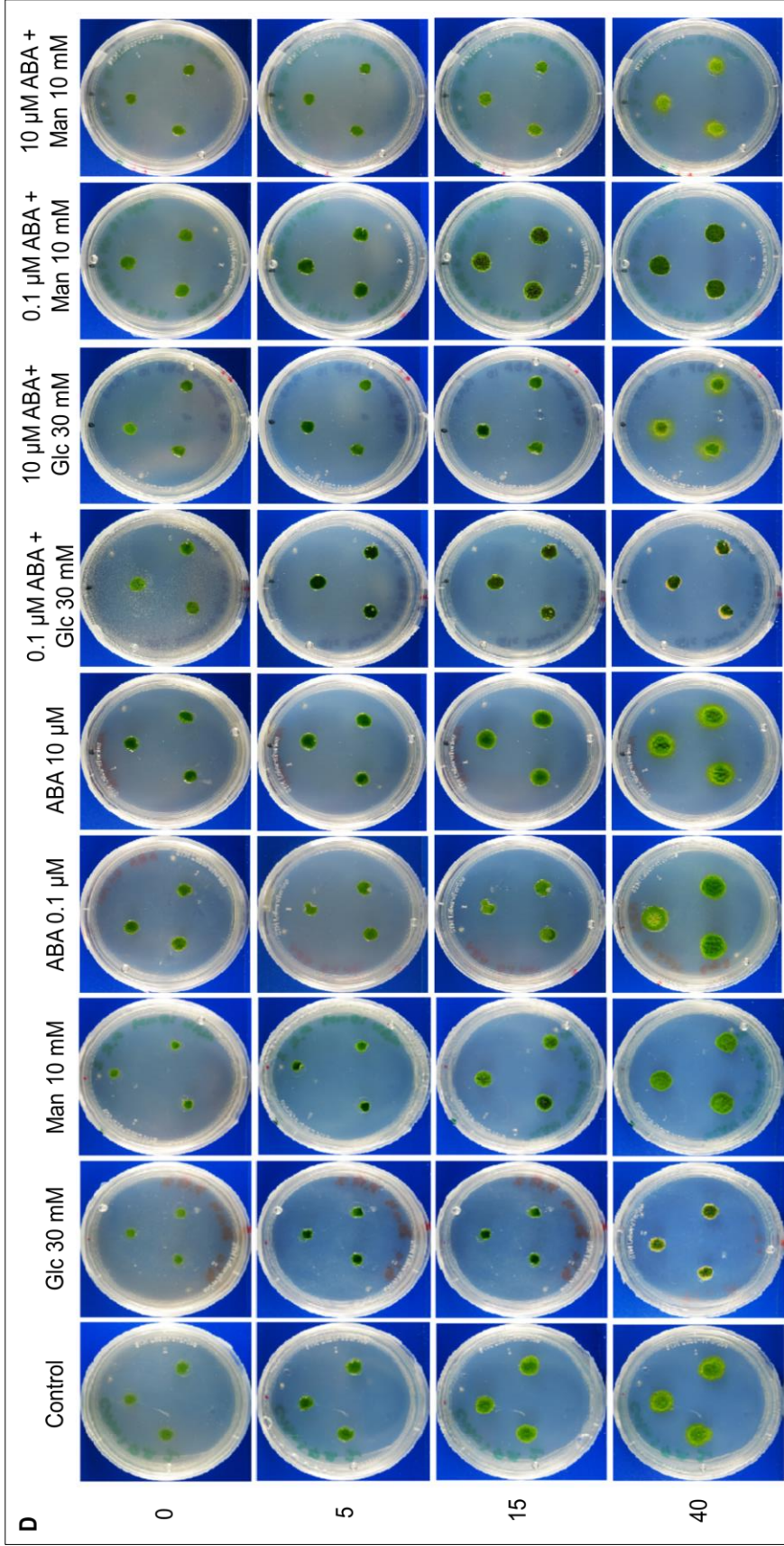


Fig. 40 La imagen panorámica muestra el desarrollo de los protonemas de *P. replicatum* sometidos a los tratamientos con Glc 30 mM/ Man 10 mM y su interacción con la fitohormona ABA, durante 40 días.

## Efecto de la Glc en el desarrollo de gametóforos en protonemas de *P. replicatum*

Durante el desarrollo de los protonemas de *P. replicatum* sometidos tanto en la condición control como en las concentraciones bajas de Glc (100 mM) y altas (300 mM) se observó nulo crecimiento de gametóforos durante 30 días, por lo que se decidió postergar el tiempo de cuantificación de estos 10 días más. Al finalizar los 40 días de desarrollo del musgo no se obtuvo crecimiento de gametóforos por lo que no se realizó el análisis fenotípico de este parámetro.

## DISCUSIÓN

### Efecto de la Glc a diferentes concentraciones en protonemas de *P. replicatum*

Los resultados en este estudio demostraron que las concentraciones bajas de Glc (100 mM) reducen significativamente el CE y provocan cambios en la coloración de los tejidos de *P. replicatum*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Chamorro-Flores (2010) quien observó que protonemas del musgo *B. billarderi Schwägr* sometidos a Glc 100 mM durante 15 días presentaron inhibición en la expansión y mayor densidad de los tejidos. Esto sugiere que las similitudes en las respuestas fenotípicas de estos dos musgos se pueden deber a que ambas son consideradas totalmente tolerantes a la desecación. Además, se ha observado que en condiciones de cultivo *in vitro*, la adición de sacarosa (0.03-0.1 M), fructosa (0.05 M) y glucosa (0.1 M) inhibe la expansión de protonemas en el musgo *A. undulatum* (Olsson *et al.*, 2003). En contraste, la misma concentración de Glc (100 mM) durante 30 días induce el crecimiento expansivo del musgo *P. patens*. Por otro lado, el hecho de que los tejidos sometidos a la condición osmótica (Stl 100 mM) presentaran mayor CE pudiera deberse a que *P. replicatum* es un musgo tolerante a estrés osmótico y concentraciones de 100 mM de Stl incrementan la densidad del tejido, preservando su verdor (Morales-Eliosa, 2010).

Las respuestas de *P. replicatum* a bajas concentraciones de Glc contrastan con lo reportado en *A. thaliana*, en donde se ha observado que bajas concentraciones de Glc promueven el desarrollo de la planta (Jang *et al.*, 1997), lo que indica respuestas diferenciales entre esta briofita y plantas vasculares.

Ya que se observó un aclaramiento en los tejidos periféricos de *P. replicatum* en Glc 100 mM, se puede especular que esto pudiera deberse a una disminución en contenido de clorofilas de los tejidos a causa de concentraciones bajas de azúcares (100 mM) como sucede en líneas transgénicas de *Arabidopsis* hipersensibles a Glc; en donde se induce la senescencia y disminuye el contenido de clorofilas, por una vía mediada por HXK, ya que se ha observado que plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan AtHXK1 muestran una marcada disminución en el contenido de clorofilas cuando se encuentran en condiciones de Glc 3% (alrededor de 150 mM) (Xiao *et al.*, 2000).

Las concentraciones altas de Glc (300 y 500 mM) tuvieron un efecto negativo en el crecimiento expansivo (CE) de *P. replicatum*. Concentraciones similares de Glc causan fenotipos de desarrollo arrestado en plantas vasculares como *Arabidopsis* (Jang *et al.*, 1997; Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Dekkers *et al.*, 2004).

Por otro lado, se observaron fenotipos con pigmentación más clara en Glc 300 mM y fenotipos con apariencia más oscura en Glc 500 mM. En el caso de Glc y Stl 300 mM, los resultados contrastan con estudios realizados en protonemas de *P. patens*, en donde la misma concentración de Glc causa un fenotipo de crecimiento abundante y de coloración oscura (Moreno-Velázquez, 2013). De igual forma, Chamorro-Flores (2010) reporta obscurecimiento del tejido en *B. billarderi* creciendo en Glc 300 mM. Moreno-Velázquez (2013) reporta fenotipos de crecimiento arrestado en protonemas de *P. patens* así como obscurecimiento del tejido en concentraciones de 500 mM de Glc. Estos estudios coinciden con los resultados obtenidos en *P. replicatum* al igual que en el musgo tolerante a la desecación *B. billarderi*, en donde también se reporta obscurecimiento de tejidos en protonemas sometidos a 500 mM de Glc durante 15 días (Chamorro Flores, 2010). Sin embargo, en la planta vascular *Arabidopsis*, estas concentraciones de Glc causan pérdida total de pigmentos, es decir, fenotipo albino a causa de la represión de genes fotosintéticos (Jang *et al.*, 1997; Arenas-Huertero *et al.*, 2000)

Concentraciones muy altas de Glc y Stl (700 y 1000 mM) causan fenotipos de crecimiento severamente arrestado así como cambios en la coloración. Estos resultados coinciden con los de Moreno-Velázquez (2013) quien encontró que protonemas de *P. patens* sometidos a las mismas concentraciones de Glc y Stl

provocan fenotipos de crecimiento arrestado y fenotipos cloróticos/albinos en Glc y Stl 1000 mM. Chamorro-Flores (2010) reporta que concentraciones de 700 y 1000 mM causan obscurecimiento de tejidos en protonemas de *B. billarderi*, lo cual coincide nuevamente con los resultados obtenidos en el presente estudio en concentraciones de 700 mM, pero contrastan con los fenotipos observados en concentraciones de 1000 mM de Glc y Stl en *P. replicatum*. Posiblemente los efectos diferenciales que pudieran tener estos dos musgos se deban a que existen respuestas especie-específicas (Sabovljevic *et al.*, 2005). Cabe destacar que en *Arabidopsis* no existen reportes utilizando estas concentraciones, pues con concentraciones de Glc menores a 400 mM, las semillas ya no germinan o la plántula que logra emerger detiene totalmente su desarrollo.

### **Efecto de la Glc sobre la EF de *P. replicatum***

La Glc en concentraciones de 100 mM tuvo un efecto negativo sobre la EF del musgo *P. replicatum*. Estos resultados contrastan con lo reportado por Moreno-Velázquez (2013), quien encontró que la EF del musgo *P. patens* se ve favorecida con concentraciones de Glc 100 mM. Por otro lado, Pourtau *et al.* (2004) reportan una disminución de la EF respecto al control, en concentraciones similares de Glc (110 mM) en *Arabidopsis*, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo para la especie *P. replicatum*.

El tratamiento de Glc 300 mM tuvo efecto negativo sobre la EF de *P. replicatum*. Este efecto negativo no ha sido observado en otra especie de musgo. Por el contrario, en protonemas de *P. patens* se reporta que la misma concentración de Glc tiene efectos positivos en la EF (Moreno-Velázquez, 2013).

Por otro lado, en concentraciones de Glc y Stl 500 mM no se lograron separar los efectos de la señalización de Glc de los del efecto osmótico, por lo que se concluyó que el efecto negativo observado se debía a un efecto osmótico. Estos resultados contrastan con lo observado en *P. patens* bajo la misma concentración de Glc (500 mM), la cual redujo la EF, mientras que la condición isosmótica tuvo efecto positivo (Moreno-Velázquez, 2013).

Los protonemas de *P. replicatum* expuestos a concentraciones de Glc y Stl de 700 y 1000 mM presentaron bajos niveles de EF, atribuible a un efecto osmótico. Estos resultados contrastan con lo reportado por Moreno-Velázquez (2013) quien encontró que la reducción de la EF en *P. patens* es un efecto específico de la señal de Glc 700 mM.

La EF de los protonemas de *P. replicatum* crecidos en Glc y Stl 1000 mM disminuyó debido a un efecto osmótico, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en *P. patens*. Además, Moreno-Velázquez (2013) reporta que la disminución en la EF en *P. patens* incrementó a lo largo del tiempo, al igual que en *P. replicatum*.

Por lo tanto *P. replicatum* es capaz de percibir diferentes concentraciones de Glc y modular su crecimiento, pigmentación y fotosíntesis en respuesta a ellas. La Glc actúa como molécula señal, cuyo efecto es dependiente de HXK y de su metabolismo (Fig. 41)

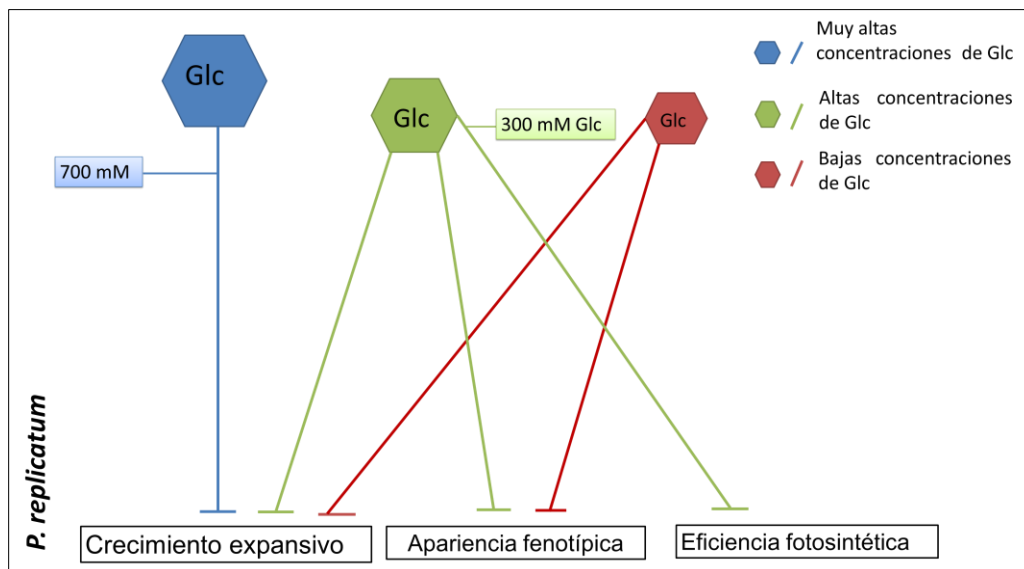


Fig. 41. Modelo del efecto de la Glc en *P. replicatum*. La Glc en concentraciones bajas (100 mM), altas (300 y 500 mM) y muy altas (700 y 1000 mM) tienen efecto negativo en el CE, apariencia fenotípica y EF en *P. replicatum*.

### Efecto de la Glc y su análogo dependiente de HXK e independiente de metabolismo (Man) en el fenotipo de *P. replicatum*

Los protonemas de *P. replicatum* sometidos a Glc 30 mM, presentaron CE limitado así como obscurecimiento del tejido central y clorosis en la periferia. Estos resultados contrastan con lo reportado por Moreno-Velázquez (2013), quien observó que protonemas de *P. patens* sometidos a la misma concentración de Glc (30 mM) tenían mayor CE.

Los fenotipos de *P. replicatum* en los tratamientos con Man 10 mM fueron similares al control tanto en la coloración como en el CE. Nuevamente bajo estas condiciones se observan diferencias con el musgo modelo *P. patens*, en donde el CE es mayor en Man 10 mM (Moreno-Velázquez, 2013). Este azúcar que también nos permite conocer si los fenotipos observados se deben a un efecto metabólico del azúcar o si implican otras vías de señalización que involucran a las HXKs, evidenció que los fenotipos observados se deben al efecto de la Glc por una vía dependiente de HXK y dependiente de su metabolismo subsecuente (Fig. 42).

Por otro lado el efecto negativo de la Glc sobre el fenotipo de un musgo tolerante a la desecación, como lo es *P. replicatum*, y el efecto positivo de la Glc en un musgo no tolerante a desecación (*P. patens*), pudieran atribuirse a una respuesta diferencial entre especies que podría tener relación con los niveles de tolerancia a estrés abiótico de dichas especies.

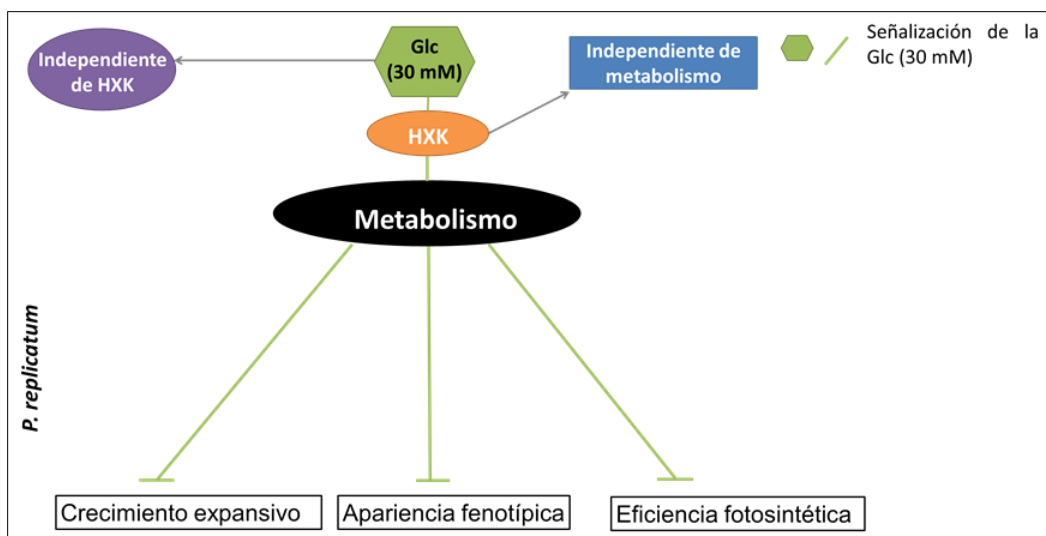


Fig. 42. Modelo de la señalización de la Glc por una vía dependiente de HXK y de metabolismo en *P. replicatum*. La Glc en concentraciones de 30 mM tiene un efecto negativo en CE, apariencia fenotípica y EF de *P. replicatum*.

### Efecto del ABA en el desarrollo de *P. replicatum*

BA, en

Se sabe que el ABA en concentraciones de 0.1 y 10  $\mu\text{M}$  tiene un efecto negativo provocando disminución en el CE del musgo *P. patens* (Thealander *et al.*, 2005). En contraste, *P. replicatum* se comporta de manera diferente cuando es expuesto a las mismas concentraciones de ABA (0.1 y 10  $\mu\text{M}$ ), ya que no se encontró un efecto en el CE. Por otro lado, protonemas sometidos a medios con ABA 0.1  $\mu\text{M}$  adicionados con Glc 30 mM presentaron una pigmentación más oscura en el centro de la colonia y blanquecina en la periferia, junto con una disminución significativa en el CE en comparación con el control. Cabe señalar que en los resultados obtenidos en este trabajo se evidenció que los tejidos crecidos en presencia de Glc 30 mM (control positivo) se comportaron de manera diferente a lo reportado en *P. patens*. Protonemas de *P. replicatum* bajo esta concentración de Glc (30 mM) presentaron disminución en el CE así como cambios en la pigmentación de los tejidos (verde oscuro al centro de los protonemas y aclaramiento de tejidos en la periferia); en contraste el crecimiento del musgo *P. patens* es mayor en tal condición (Moreno-Velázquez, 2013).

En *P. patens*, concentraciones de ABA 10  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM provocan inhibición del crecimiento y desarrollo del musgo, es decir, hipersensibilizan los tejidos a la Glc como

ocurre en *Arabidopsis* con concentraciones menores de ABA (100 nM) aunque mayores de Glc (388 mM) (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Esto contrasta con lo observado en *P. replicatum* en cuyos protonemas sometidos a ABA 10  $\mu$ M + Glc 30 mM presentaron pigmentación ligeramente más opaca que el control y no se observaron cambios drásticos en el CE en comparación con el control (PpNH<sub>4</sub>).

Al aplicar Man ABA 0.1  $\mu$ M + Man 10 mM, los protonemas presentaron pigmentación más oscura en el centro y aclaramiento de los tejidos en la periferia. Además los protonemas presentaron reducción significativa en el CE en comparación con Man 10 mM y el control negativo (PpNH<sub>4</sub>). En contraste con resultados en *P. patens* en el que ABA 0.1  $\mu$ M + Man 10 mM potencia el CE.

Los fenotipos observados sugieren que específicamente bajo las condiciones (ABA 0.1  $\mu$ M + Man 10 mM) se evidencia la existencia de una interacción entre la vías de señalización de la Glc y de ABA en el musgo tolerante a la desecación *P. replicatum*. El efecto de la Glc sobre el fenotipo de *P. replicatum* responde a una vía dependiente de HXK e independiente de metabolismo (Fig. 43).

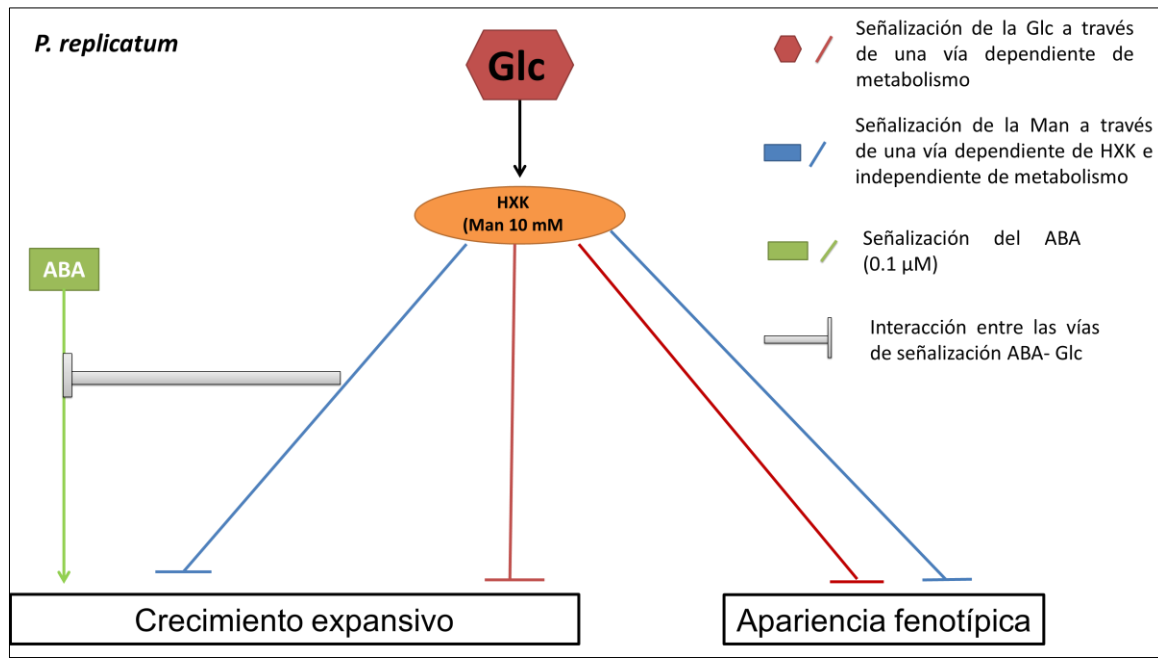


Fig. 43. Modelo de interacción de las vías de señalización de activadas por Glc y ABA a través de una vía dependiente de HXK e independiente de metabolismo en *P. replicatum*. La Glc (30 mM) y la Man (10 mM) tienen un efecto negativo en CE y apariencia fenotípica de *P. replicatum*. La señal positiva de ABA en el CE es bloqueada por la señal negativa de la Man, es decir, se evidencia una interconexión entre la vía de señalización de la Glc y la vía de señalización de la hormona ABA por una vía dependiente de HXK e

### Efecto de la Glc o su análogo (Man) dependiente de HXK, en presencia de fitohormonas, en el desarrollo de *P. patens*

Como se mencionó anteriormente, los protonemas de *P. patens* sometidos a concentraciones bajas de ABA (0.1  $\mu\text{M}$ ) + Glc 30 mM provocan un potenciamiento en el CE al igual que en el número y tamaño de los gametóforos, lo que indica que el efecto negativo que genera la hormona sola, ABA 0.1  $\mu\text{M}$  (disminución en el CE y en el número de gametóforos) es contrarrestado por el efecto positivo de la Glc (30 mM). Estudios en *P. patens* (Moreno-Velázquez, 2013) reportan que esta misma concentración de Glc provoca aumento en el CE así como en el número y tamaño de los gametóforos. Las respuestas de *P. replicatum* al utilizar Man 10 mM (análogo no metabolizable) con ABA 0.1  $\mu\text{M}$  fueron similares a las observadas en los tratamientos con Glc y ABA (ABA 0.1  $\mu\text{M}$  + Glc 30 mM), es decir, mayor CE, número y tamaño de gametóforos. El efecto negativo de ABA 0.1  $\mu\text{M}$  nuevamente fue contrarrestado por el efecto positivo de la Man, ya que está en concentraciones de 10 mM favorecen el crecimiento, número y tamaño de los gametóforos (Moreno Velázquez, 2013).

Los protonemas crecidos en medios con altas concentraciones de ABA (10  $\mu\text{M}$ ) adicionados tanto con Glc 30 mM como con Man 10 mM presentaron afectación severa en crecimiento y desarrollo del musgo *P. patens*, es decir, la presencia de esta fitohormona en tal concentración hipersensibiliza los protonemas a la Glc, provocando disminución drástica en el CE y en la formación de los gametóforos. Esta hipersensibilización ocurre también en la planta vascular *Arabidopsis* (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Los resultados indican que el efecto positivo de la Glc y la Man no es capaz de contrarrestar el efecto negativo de ABA 10  $\mu\text{M}$  (disminución en el CE y nula formación de gametóforos) en esta especie de briofita.

Estos resultados indican que existe intercomunicación de las vías de señalización de Glc-ABA, esta intercomunicación está conservada en plantas vasculares (*A. thaliana*) y no vasculares (*Physcomitrella patens*), por lo que surgió muy temprano en la evolución de las plantas terrestres. Además la vía de señalización activada es una vía dependiente de HXK e independiente del metabolismo (Fig. 44).

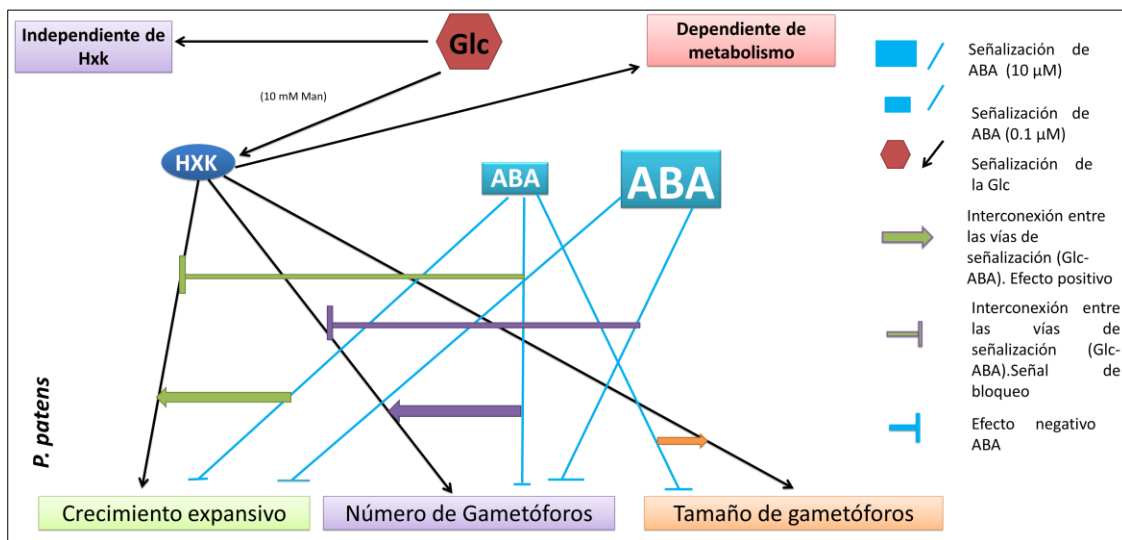


Fig. 44. Modelo de interacción de las vías de señalización de activadas por Glc y ABA en *P. patens*. La señal (negativa) de 0.1 μM de ABA se interconecta con la señal (positiva) de Glc, el efecto negativo de ABA es contrarrestado por el efecto positivo de la Glc, dicha interconexión provoca un potenciamiento en el CE, número y tamaño de los gametóforos del musgo. Por otro lado la señal negativa de 10 μM de ABA en el fenotipo de *P. patens* bloquea la señalización positiva de la Glc, provocando también evidenciaron la existencia de una interconexión entre la vía de señalización de la Glc y la vía de la fitohormona BAP. Como se mencionó anteriormente, el CE de los protonemas sometidos a BAP 0.1 μM + Glc 30 mM y BAP 10 μM + Glc 30 mM fue parecido a los controles tanto positivo (Glc 30 mM) como negativo (PpNH<sub>4</sub>). El número de gametóforos disminuyó en ambas concentraciones y se observaron cambios en la morfología de los gametóforos, característica muy notoria. En el caso de esta citocinina el efecto negativo de BAP en el crecimiento expansivo (Thealander *et al.*, 2005), número y morfología de los gametóforos contrarresta el efecto estimulante de la Glc sobre crecimiento expansivo y desarrollo de lo gametóforos. Estas observaciones

evidencian una intercomunicación entre la vía de Glc y BAP en *P. patens*. Cabe mencionar que no existen estudios semejantes en otras especies vegetales.

Por otro lado, utilizando Man como análogo no metabolizable, los protonemas en concentraciones de BAP 0.1µM + Man 10 mM incrementaron el CE, mientras que la concentración más alta de BAP adicionada con Man (BAP 10 µM + Man 10 mM) presentó un comportamiento semejante al control positivo (Man 10 mM), por lo que el efecto ligeramente negativo de BAP en el CE se anula ante el efecto estimulante de Man 10 mM. El número de gametóforos incrementó en la concentración más baja de BAP adicionada con Man (BAP 0.1µM + Man 10 mM). Aunque el número de gametóforos no supera al obtenido en el control positivo (Man 10 mM), el incremento fue drástico comparado con el comportamiento observando en BAP 0.1 µM en donde el número gametóforos fue menor a BAP 10 µM. Estos datos indican que la intercomunicación de vías de respuesta a Glc-BAP es dependiente de HXK e independiente de metabolismo. En la planta modelo *A. thaliana* se ha reportado una intercomunicación de las vías de señalización de Glc y Citocininas, dicha intercomunicación es por una vía dependiente de HXK pero es aún incierto si depende o no del metabolismo subsecuente de la Glc (Ramón, *et al.*, 2008).

*De acuerdo a lo anterior, la intercomunicación de vías Glc-Citocinina (BAP) implica vías dependientes de HXK e independientes de metabolismo en P. patens (Fig. 45).*

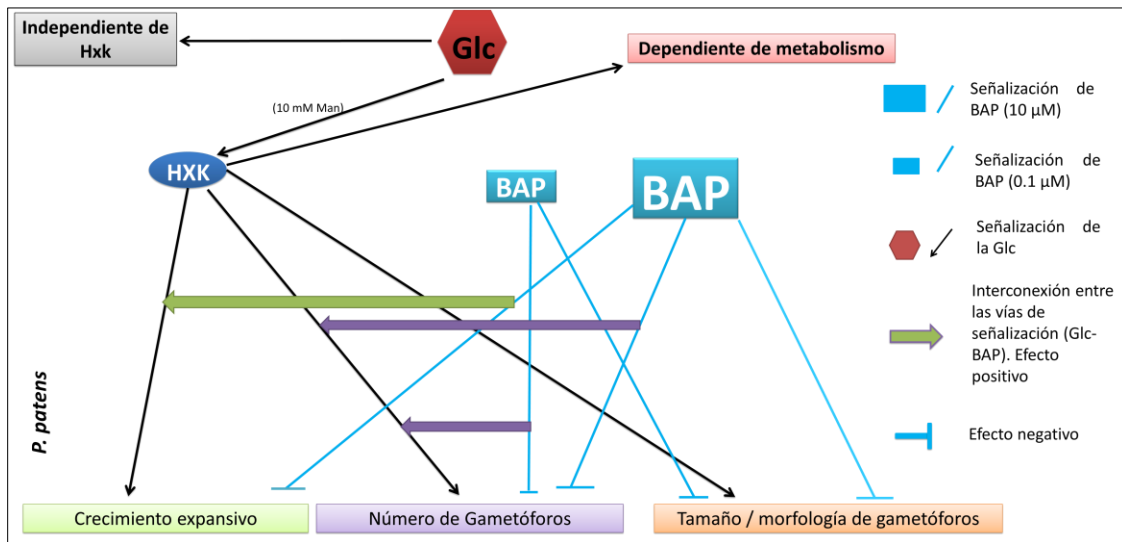


Fig. 45. Modelo de interacción de las vías de señalización de activadas por Glc y BAP en *P. patens*. La señal (negativa) de 0.1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de BAP se interconecta con la señal (positiva) de Glc, el efecto negativo de BAP es contrarrestado por el efecto positivo de la Glc, dicha interconexión provoca un efecto positivo en CE y el gametóforos.

Los protonemas de *P. patens* sometidos a IAA 5  $\mu\text{M}$  presentaron un incremento significativo en el CE, mientras que en IAA 10  $\mu\text{M}$  se presentó un comportamiento semejante al control. Por otro lado, el número de gametóforos en ambas concentraciones de IAA (5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ) se observó similar al control. Estos resultados contrastan con estudios realizados en *P. patens* en los que se ha reportado que la adición de IAA 10  $\mu\text{M}$  provoca disminución del diámetro de la colonia así como menor formación de tejido joven (protonema) (Ludwig-Müller *et al.*, 2008).

En presencia de Glc 30 mM hubo un incremento en el CE de protonemas sometidos a 5  $\mu\text{M}$  IAA + Glc 30 mM y 10  $\mu\text{M}$  IAA + Glc 30 mM comparado con el control negativo (PpNH<sub>4</sub>), este incremento es más notorio en la concentración más baja (5  $\mu\text{M}$  IAA + Glc 30 mM), en donde el crecimiento fue comparable al control positivo (Glc 30 mM). Por lo que el efecto positivo de la auxina IAA en concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  se suma al efecto positivo de la Glc 30 mM; y el efecto negativo que pudiese tener IAA 10  $\mu\text{M}$  en el CE de *P. patens* es contrarrestado por el efecto positivo de la Glc, lo que implica que ambas vías se intercomunican. Esta intercomunicación también ha sido evidenciada en *Arabidopsis*, pues mutantes resistentes a las auxinas (*axr1*, *axr2* y *tir1*) son insensibles al efecto negativo de la Glc (6%) (Moore *et al.*, 2003).

En cuanto al número de gametóforos se observó un mayor número en la concentración más alta de IAA adicionada con Glc (IAA 10  $\mu$ M IAA + Glc 30 mM). En contraste la concentración más baja (IAA 5  $\mu$ M + Glc 30 mM) presentó un comportamiento similar al control positivo (Glc 30 mM). Estas observaciones evidenciaron una intercomunicación entre la vía de señalización de la Glc y las vías de señalización de IAA, lo que nos indica que la comunicación entre las vías de señalización activadas por Glc y auxinas se conserva en plantas no vasculares como lo son los musgos al igual que en *A. thaliana*.

En relación a los tratamientos con Man 10 mM + IAA 5  $\mu$ M o 10  $\mu$ M, el comportamiento fue similar a los tratamientos con Glc 30 mM e IAA, es decir mayor crecimiento en concentraciones bajas de IAA (5  $\mu$ M) adicionadas con Glc y menor CE en IAA 10  $\mu$ M + Man 10  $\mu$ M. Por lo que el efecto estimulante de la Man en concentraciones de 10 mM (Moreno-Velázquez, 2013) se suma el efecto positivo de IAA 5  $\mu$ M; y el efecto negativo de 10  $\mu$ M IAA es contrarrestado por el efecto positivo de Man 10 mM. Por otro lado, el número de gametóforos de *P. patens* fue menor en la concentración más baja de IAA (5  $\mu$ M) con 10 mM Man. La concentración más alta (IAA 10  $\mu$ M + Man 10 mM) produjo un aumento en el número de gametóforos. Entonces el efecto estimulante de la Man contrarresta el negativo de IAA 10  $\mu$ M en el musgo *P. patens*. Cabe mencionar que no existen estudios semejantes en otras especies de plantas. Con base a lo anterior se concluye que existe una intercomunicación de vías Glc-Auxina (IAA) y que esta intercomunicación es por una vía dependiente de HXK e independiente de metabolismo (Fig. 46). En contraste se sabe que existe intercomunicación entre las vías de señalización de azúcares y auxinas en *A. thaliana*, pero esta intercomunicación es a través de una vía independiente de metabolismo (Ramon *et al.*, 2008).



## CONCLUSIONES

### Particulares

#### Objetivo No. 1

- Las concentraciones bajas de Glc (100 mM) tienen un efecto negativo en el crecimiento y pigmentación de *P. replicatum*
- Las concentraciones altas de Glc (300 y 500 mM) provocan cambios en la pigmentación así como disminución en el CE en *P. replicatum* de forma independiente y diferenciable del efecto osmótico

#### Objetivo No. 2

- La Glc en concentraciones de 300 mM modula la fotosíntesis provocando un efecto negativo en la eficiencia fotosintética del musgo tolerante a la desecación *P. replicatum*, las concentraciones 100, 500, 700 y 1000 mM no tuvieron efectos diferenciables del efecto osmótico

#### Objetivo No. 3

- *P. replicatum* detecta y responde a la Glc por una vía dependiente de HXK y de metabolismo

#### Objetivo No. 4

- ABA, BAP y GA<sub>3</sub> reducen el crecimiento del musgo *P. patens*
- ABA y BAP disminuyen el número de gametóforos, esta última fitohormona también causa cambios en la morfología de *P. patens*.
- La auxina IAA 5μM promueve el crecimiento y desarrollo de *P. patens* y 10 μM inhibe ligeramente su crecimiento
- En *P. patens* existe intercomunicación entre las vías de señalización de Glc y ABA, citocininas (BAP) y auxinas (IAA) por una vía dependiente de HXK e independiente del metabolismo
- En el musgo *P. replicatum* existe una intercomunicación entre la vía de señalización de la Glc y la vía de señalización de ABA, (evidenciada en

condiciones de ABA 0.1  $\mu$ M y Man10 mM), dicha intercomunicación es a través de una vía dependiente de HXK e independiente de metabolismo

## Generales

- La Glc representa una señal que regula características fenotípicas y fisiológicas del musgo tolerante a la desecación *P. replicatum*
- La capacidad de *P. replicatum* de responder a Glc por vías dependientes de HXK y de metabolismo, así como por una independiente del metabolismo, sugiere que se conservan en plantas vasculares y no vasculares como lo son los musgos
- La interconexión entre las vías de señalización de los azúcares y hormonas surgieron muy temprano en la evolución de las plantas terrestres y se preserva en plantas vasculares

## PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la Glc a diferentes concentraciones en la pigmentación de *P. replicatum* mediante la cuantificación de pigmentos, como clorofilas, carotenos y antocianinas
- Realizar experimentos de exposición de protonemas a concentraciones más altas de ABA (mayores a 10  $\mu\text{M}$ ) para determinar si esta hormona a concentraciones más altas, reprime el desarrollo de *P. replicatum*, como se ha reportado en *P. patens*
- Identificar genes involucrados en las vías de señalización activadas por Glc en *P. replicatum*
- Realizar experimentos de exposición de protonemas de *P. replicatum* a medios  $\text{PpNH}_4$  en ausencia de tartrato de amonio y adicionados con Glc (100 y 300  $\text{Mm}$ ) para evaluar el desarrollo de gametóforos y otras etapas de desarrollo en *P. replicatum*
- Realizar un análisis transcriptómico y proteómico en *P. replicatum* en respuesta a Glc

## BIBLIOGRAFÍA

- Ashton N, Grimsely N, Cove D. 1979. Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427–435
- Arenas F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J. y León P. 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development* 14: 2085-2096
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein J.M, Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448: 938-944
- Benzanilla Lab. 2008. pp. 35-37
- Brandes H, Kende H. 1968. Studies on Cytokinin-Controlled Bud Formation in Moss Protonemata. *Plant Physiology* 43:827-837
- Caspari T, Will A, Opekarova M, Sauer N, Tanner W. 1994. Hexose/H<sup>+</sup> symporters in lower and higher plants. *Journal Experimental Botany* 196:483-491
- Chaban C, Kordyum E, L Demkiv O, Khorkavtsiv O, Khorkavtsiv L. 1999. The gravireaction of *Ceratodon protonemata* treated with gibberellic acid. *Advances in Space Research* 24:717-721
- Chamorro-Flores A. 2009. Análisis de la participación del ácido abscísico en la respuesta del musgo *Plagiomnium cuspidatum* ante estrés abiótico. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala .p.p. 1-112
- Chamorro-Flores A. 2010. Análisis fenotípico y fisiológico del musgo *Bryum Billarderi* Schwar en respuesta glucosa y ácido abscísico. Tesis de Maestría. Centro de investigación de Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional. pp.1-81
- Decker E, Frank W, Saringhausen E, Reski R. 2006. Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biology* 8: 397-405
- Delgadillo, C. 2003. Briofitas. Sociedad Latinoamericana de Briología.

- Finkelstein R, Gampala S, Rock C. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15-S45
- Glimn-Lacy J, Kaufman P. 2006. Introduction to plants, major groups, flowering plants families. *Botany Illustrate*. Second edition pp. 63-290
- Goffinet B, Buck W. 2004. Systematics of the Bryophyta (mosses): from molecules to a revised classification. *Molecular Systematics of Bryophytes. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 98: 205–239
- Goffinet B, Shaw A. 2009. *Bryophyte Biology*. Second edition. Cambridge University Press pp. 565
- Gupta A, Kaur N. 2005. Review Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plant. Department of Biochemistry and Chemistry. Punjab Agricultural University, Ludhiana 141 004, India. pp.1-16
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks M, Smeekens S. 2008. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2 *Plant Journal* 53: 935-949
- Hanson J, Smeekens S. 2009. Sugar perception and signaling an update. *Current opinion in Plant Biology* 12:562–567
- Jang J, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665–1679
- Jang J, Leon P, Zhou L, Sheen J. 1997. Hexocinase as sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9:5-19
- Johri M. Desai S. 1973. Auxin regulation of caulonema formation in moss protonema. *Nature (London), New Biology* 245: 223-224
- Koch K, Nolte D, Duke R, Mcarty R, Avigne T. 1992. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *The Plant cell* 4:59-69
- Kolbe A, Tiessen A, Schlupepmann, H, Paul, M, Ulrich, S, Geigenberger P. 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11118-11123.
- Lambers H, Chapin III, Pons L. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer Verlag, York PA.
- Loreti E, Bellis L, Alpi A, Perata P. 2001. Why and how do plants cells sense sugars?. *Annals of Botany* 88: 803-812
- Morales-Eliosa E. 2010 Estudio de las respuestas fenotípicas y fisiológicas del musgo *Ceratodon stenocarpus* ante estrés osmótico salinidad y congelación bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Tesis de maestría. Centro de investigación de Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional. pp.1-98. *Adendum*: cambio de nombre de la especie a *P. replicatum*
- Moreno-Velázquez F. 2013. *Physcomitrella Patens* en respuesta a Glucosa: Un estudio fenotípico, Fisiológico y Espectroscópico. Tesis de maestría. Centro de investigación de

- Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional. pp.1-93
- Melvin J, Tuba Z, Mishler B. 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* 151: 85-100
- Nishiyama T, Fujita T, Shin-I T, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, Kohara Y, Hasebe M. 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: Implication for land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 8007–8012
- Olsson T, Thelander M, Ronne H. 2003. A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *The Journal of Biological Chemistry* 278:44439–44447
- Proctor M. 1990. The Physiological basis of bryophyte production. *Botanical Journal of Linnean Society* 104: 61-77
- Ramon M, Rolland F, and Sheen J. 2008. Sugar Sensing and Signaling. *The Arabidopsis Book* 10.1199/tab.0117
- Ríos-Melendez S. 2011. *Ceratodon stenocarpus*, una briofita adaptada al estrés abiótico pp. 1-5. *Adendum: cambio de nombre de la especie a P. replicatum*
- Ríos Melendez S. 2010. Estudios fisiológicos de las respuestas que presenta el musgo *Ceratodon stenocarpus* ante estrés osmótico y salino. Tesis de maestría. Centro de investigación de Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional. pp. 1-90. *Adendum: cambio de nombre de la especie a P. replicatum*
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein M. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences* 26:9-12
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006 Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 310-317
- Rosa M, Prado C, Podazzo G, Interdonato R, Gonzalez J, Hilal M, Prado E. 2009. Soluble sugars: metabolism, sensing, and abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 4: 388-393
- Roitsch T, Bittner M, Godt E. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* 108 285–294
- Sabovljević A, Sabovljević M, Grubišić D, Konjević R. 2005. Effect of sugars on development of two moss species (*Bryum argenteum* and *Atrichum undulatum*) during in vitro culture. *Belgian journal of botany* 138: 79-84
- Scott F Gilbert. 2000. *Developmental Biology*. Swarthmore College. pp. 348
- Schnepf E, Reinhard C. 1997 Brachyocytes in *Funaria* protonemate: induction by abscisic acid and fine structure. *Journal of Plant Physiology* 151, 166–175.
- Schumakerl S, Dietrich A. 1997. Programmed Changes in Form during Moss Development. *The Plant Cell* 9: 1099-1 107.

- Sharp A.S, Crum H y Eckel PM. 1994. The moss flora of Mexico. 1° Ed. The New York Botanical Garden pp. 530-532
- Shaw A.J. y Renzaglia K.S. 2004. Phylogeny and diversification of bryophytes. American Journal of Botany 91:1557-81
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2004. Plant Physiology. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Thelander M., Olsson T. y H. Ronne. 2005. Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. Journal of Experimental Botany 56 (412): 653–662
- Valadez-Hernández E. 2013, *Pseudocrossidium replicatum* en estrés abiótico: Un abordaje transcriptómico. Tesis de maestría pp.1-92
- Wang, W., Vinocur., B., Altman, A. 2003. Plant responses to drought salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U. 1997. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in Fava bean seeds. The Plant Cell 9:895–908
- Wood A.J. 2007. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. The bryologist 110: 163-17
- Xiao W, Sheen J, Jang JC. 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. Plant Mol. Biol. 44: 451-456
- Yasumura, Y., Crumpton-Taylor, M, Fuentes, S. y N. P. Harberd (2007). Step-by-step acquisition of the giberellin-DELLA growth-regulatory mechanism during land-plant evolution. Current Biology 17, 1225-1230

## REFERENCIAS PAGINAS WEB

<http://www3.inecol.edu.mx/briologia/index.php/clasificacion-de-las-briofitas/antoceros>

[http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran\\_familia/plantas/musgos/musgos.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/musgos/musgos.html)

<http://www.briolat.org/>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=ps\\_eudocrossidium+replicatum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=ps_eudocrossidium+replicatum)

# ANEXOS

## ANEXO 1. Especies de musgo tolerantes a desecación

Tablas 1-4. Clases, órdenes y especies de musgos tolerantes a la desecación. A=Tolerante al 30% HR o por debajo, B= tolerante al 75% HR, B(A)= tolerante al 75% HR y tolerante al 30% HR y X= especies tolerantes que no pueden ser claramente asignados a una categoría. Tomado de Goffinet *et al.*, 2004.

Class/Order/Species	DT Category	Citation
I. ANDREAEOPSIDA		
1. Andreaeales		
<i>Andreaea rothii</i>	A	Dilks & Proctor 1976
II. POLYTRICHOPSIDA		
1. Polytrichales		
<i>Atrichum androgynum</i>	A	Beckett et al. 2005
<i>Atrichum undulatum</i>	B (A)	Abel 1956; Beckett et al. 2000
<i>Pogonatum aloides</i>	B (A)	Abel 1956
<i>Pogonatum perichaetiale</i>	A	Proctor 2005
<i>Polytrichadelphus aristatus</i>	A	Proctor 2005
<i>Polytrichum formosum</i> (= <i>P. attenuatum</i> )	A	Abel 1956; Ochi 1952b
<i>Polytrichum juniperinum</i>	A	Proctor 2005
III. BRYOPSIDA		
1. Grimmiales		
<i>Grimmia</i> sp.	A	Abel 1956
<i>Grimmia anodon</i>	A	Rundel & Lange 1980
<i>Grimmia elatior</i>	A	Malta 1921
<i>Grimmia laevigata</i>	A	Keever 1957
<i>Grimmia muhlenbeckii</i>	A	Malta 1921
<i>Grimmia orbicularis</i>	A	Alpert 1979
<i>Grimmia ovata</i>	A	Irmscher 1912
<i>Grimmia pulvinata</i>	A	Abel 1956; Irmscher 1912
<i>Racomitrium aciculare</i>	A	Abel 1956
<i>Racomitrium canescens</i>	A	Abel 1956; Irmscher 1912
<i>Racomitrium heterostichum</i>	A	Irmscher 1912
<i>Racomitrium lanuginosum</i>	A	Dilks & Proctor 1974
<i>Schistidium apocarpum</i>	A	Alpert & Oechel 1987
2. Dicranales		
<i>Amphidium lapponicum</i>	B	Abel 1956
<i>Ceratodon purpureus</i>	(A)	Abel 1956
<i>Dicranodontium denudatum</i>	B	Abel 1956
<i>Dicranoloma fragiliforme</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Dicranoweisia cirrata</i>	A	Malta 1921
<i>Dicranum fuscescens</i>	A	Irmscher 1912
<i>Dicranum japonicum</i>	B	Ochi 1952a, b
<i>Dicranum majus</i>	A	Smimoff 1992
<i>Dicranum scoparium</i>	A	Abel 1956; Irmscher 1912, Nörr 1974
<i>Dicranum viride</i>	A	Abel 1956
<i>Fissidens adianthoides</i>	B	Abel 1956
<i>Fissidens bryoides</i>	A	Abel 1956
<i>Fissidens crassipes</i>	A	Abel 1956
<i>Fissidens dubius</i> (= <i>F. cristatus</i> )	B	Abel 1956
<i>Fissidens taxifolius</i>	A	Abel 1956
<i>Paraleucobryum longifolium</i>	A	Abel 1956

Class/Order/Species	DT Category	Citation
<b>3. Orthotrichales</b>		
<i>Macromitrium gymnostomum</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Orthotrichum anomalum</i>	A	Alpert & Oliver 2002
<i>Orthotrichum cupulatum</i>	A	Deltoro et al. 1998
<i>Orthotrichum rupestre</i>	A	Malta 1921
<i>Orthotrichum stramineum</i>	A	Irmscher 1912
<i>Orthotrichum tenellum</i>	A	Irmscher 1912
<i>Ulota ludwigii</i>	A	Irmscher 1912
<i>Ulota crista</i> (= <i>U. crispula</i> )	A	Hosokawa & Kubota 1957; Proctor 2001
<b>4. Hookeriales</b>		
<i>Hookeria lucens</i>	A	Dilks & Proctor 1974
<b>5. Hypnales</b>		
<i>Anomodon giraldii</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957; Ochi 1952b
<i>Anomodon longifolius</i>	A	Malta 1921
<i>Anomodon rostratus</i>	A	M. C. F. Proctor, pers. comm.
<i>Anomodon viticulosus</i>	A	Hinshiri & Proctor 1971; Proctor 1972
<i>Boulaya mittenii</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Brachythecium rivulare</i>	A	Abel 1956
<i>Campylium sommerfeltii</i>	B (A)	Abel 1956
<i>Cirriphyllum cirrosom</i>	(B)	Abel 1956
<i>Climacium dendroides</i>	(B)	Abel 1956
<i>Eurhynchium pumilum</i> (= <i>Rhynchostegiella pallidirostra</i> )	B (A)	Abel 1956
<i>Eurhynchium speciosum</i>	(A)	Abel 1956
<i>Eurhynchium striatum</i>	A	Abel 1956
<i>Fabronia ciliaris</i>	A	M. C. F. Proctor, pers. comm.
<i>Floribundaria floribunda</i>	A	Proctor 2002
<i>Fontinalis antipyretica</i>	A	Irmscher 1912
<i>Fontinalis novae-angliae</i>	A	Glime & Carr 1974
<i>Fontinalis squamosa</i>	A	Abel 1956
<i>Forsstroemia cryphaeoides</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Homalothecium sericeum</i>	A	Romose 1940
<i>Homaliodendron scapellifolium</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Hylocomium cavifolium</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Hylocomium splendens</i>	B (A)	Abel 1956; Dilks & Proctor 1974
<i>Hypnum cupressiforme</i>	A	Nörr 1974
<i>Isothecium subdiversiforme</i>	A	Ochi 1952a
<i>Leptodon smithii</i>	A	Proctor & Tuba 2002
<i>Leucodon sciuroides</i>	A	Abel 1956; Proctor 2003
<i>Neckera complanata</i>	A	Abel 1956
<i>Neckera crista</i>	A	Abel 1956; Dilks & Proctor 1974
<i>Neckera yezoana</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957; Ochi 1952b
<i>Macrosporiella scabriesta</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Macrosporiella cozoides</i>	A	Ochi 1952a
<i>Meteoridium remotifolium</i>	A	León et al. 2006
<i>Meteorium nigrescens</i>	A	León et al. 2006
<i>Phyllogonium viscosum</i>	A	León et al. 2006
<i>Pilotrichella ampullacea</i>	A	Proctor 2002
<i>Pilotrichella flexilis</i>	A	León et al. 2006
<i>Plagiothecium cavifolium</i> (= <i>P. roeseanum</i> )	B (A)	Abel 1956
<i>Plagiothecium denticulatum</i>	B (A)	Abel 1956

Class/Order/Species	DT Category	Citation
<i>Plagiothecium nemorale</i> (= <i>P. neglectum</i> & <i>P. sylvaticum</i> )	B (A)	Abel 1956
<i>Plagiothecium platyphyllum</i>	B	Abel 1956
<i>Plagiothecium succulentum</i>	B (A)	Abel 1956
<i>Plagiothecium undulatum</i>	A	Dilks & Proctor 1974
<i>Pleurozium schreberi</i>	A	Abel 1956; Nörr 1974
<i>Prionodon densus</i>	A	León et al. 2006
<i>Pterobryon arbuscula</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Pterogonium gracile</i>	A	Abel 1956
<i>Rhytidiadelphus loreus</i>	A	Abel 1956; Dilks & Proctor 1974
<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	A	Abel 1956
<i>Rhytidiadelphus triquetrus</i>	B	Abel 1956
<i>Sanionia uncinata</i>	B (A)	Abel 1956
<i>Scorpiurium circinatum</i>	A	Dilks & Proctor 1974
<i>Stereophyllum radiculosum</i>	A	M. C. F. Proctor, pers. comm. K
<i>Thamnobryum sandei</i> (= <i>Thamnum sandei</i> )	A	Hosokawa & Kubota 1957; Ochi 1952b
<i>Thuidium cymbifolium</i>	A	Hosokawa & Kubota 1957
<i>Thuidium japonicum</i>	A	Ochi 1952a
<i>Thuidium tamariscinum</i>	A	Smirnov 1992
<i>Thuidium urceolatum</i>	B	Biebl 1964
<i>Weymouthia mollis</i>	A	Proctor 2004
<i>Weymouthia cochlearifolia</i>	A	Proctor 2004
<b>6. Encalyptales</b>		
<i>Encalypta streptocarpa</i> (= <i>E. contorta</i> )	A	Abel 1956
<b>7. Hedwigiales</b>		
<i>Hedwigia ciliata</i> (= <i>H. albicans</i> )	A	Abel 1956; Ochi 1952b
<b>8. Pottiales</b>		
<i>Anoetangium aestivum</i> (= <i>A. compactum</i> )	A	Malta 1921
<i>Barbula fallax</i>	X	Di Nola et al. 1983
<i>Barbula unguiculata</i>	B	Abel 1956
<i>Bryoerythrophyllum recurvirostrum</i> (= <i>Erythrophyllum rubellum</i> )	A	Abel 1956; Imscher 1912
<i>Crossidium crassinerve</i>	A	Stark & Delgado 2003
<i>Didymodon insulanus</i> (= <i>Oxystegus cylindricus</i> )	A	Abel 1956
<i>Didymodon tophaceus</i> (= <i>Barbula tophacea</i> )	X	Di Nola et al. 1983
<i>Octoblepharum albidum</i>	X	Egunyomi 1979
<i>Pleurochaete squarrosa</i>	A	Deltoro et al. 1998; Proctor 2001
<i>Pseudocrossidium crinitum</i>	X	Rundel & Lange 1980
<i>Syntrichia caninervis</i> (= <i>Tortula caninervis</i> )	A	Oliver et al. 1993
<i>Syntrichia intermedia</i> (= <i>Tortula intermedia</i> )	A	Hearnshaw & Proctor 1982
<i>Syntrichia norvegica</i> (= <i>Tortula norvegica</i> )	A	Oliver et al. 1993
<i>Syntrichia pagorum</i> (= <i>Tortula pagorum</i> )	A	Alpert 1979
<i>Syntrichia ruraliformis</i> (= <i>Tortula ruraliformis</i> )	A	Dilks & Proctor 1974
<i>Syntrichia ruralis</i> (= <i>Tortula ruralis</i> )	A	Abel 1956; Imscher 1912
<i>Tortula brevissima</i>	X	Di Nola et al. 1983
<i>Tortella inclinata</i>	A	Imscher 1912
<i>Tortula inermis</i>	X	Alpert 1979
<i>Tortula lanceola</i> (= <i>Pottia lanceolata</i> )	A	Imscher 1912
<i>Tortula muralis</i> (= <i>Barbula muralis</i> )	A	Imscher 1912
<i>Tortula revolvens</i> (= <i>Barbula fiorii</i> )	A	Imscher 1912
<i>Weissia controversa</i>	X	Alpert 1979

Tabla 3.

Class/Order/Species	DT Category	Citation
<b>9. Bryales</b>		
<i>Bartramia stricta</i>	A	Abel 1956
<i>Bryum algovicum</i> (= <i>B. pendulum</i> )	A	Abel 1956
<i>Bryum argenteum</i>	A	Irmscher 1912; Malta 1921
<i>Bryum caespiticium</i>	A	Abel 1956; Irmscher 1912
<i>Bryum capillare</i>	A	Abel 1956
<i>Mnium hornum</i>	B (A)	Abel 1956; Nörr 1974
<i>Mnium marginatum</i>	(A)	Abel 1956
<i>Mnium spinosum</i>	B (A)	Abel 1956
<i>Mnium stellare</i>	B (A)	Abel 1956
<i>Plagiomnium cinclidooides</i> (= <i>Pseudobryum cinclidooides</i> )	B	Abel 1956
<i>Plagiomnium cuspidatum</i> (= <i>Mnium cuspidatum</i> )	B (A)	Abel 1956; Streusand et al. 1986
<i>Plagiomnium elatum</i> (= <i>Mnium seligeri</i> )	B (A)	Abel 1956
<i>Plagiomnium maximoviczii</i> (= <i>Mnium maximowiczii</i> )	A	Ochi 1952a
<i>Plagiomnium medium</i> (= <i>Mnium medium</i> )	(A)	Abel 1956
<i>Plagiomnium rostratum</i> (= <i>Mnium rostratum</i> )	(A)	Abel 1956
<i>Plagiomnium undulatum</i> (= <i>Mnium undulatum</i> )	A	Abel 1956
<i>Pohlia cruda</i>	B (A)	Abel 1956
<i>Pohlia elongata</i>	(A)	Abel 1956
<i>Pohlia ludwigii</i>	B	Abel 1956
<i>Pohlia rothii</i>	A	Abel 1956
<i>Rhizomnium punctatum</i>	B (A)	Abel 1956
<b>10. Splachnales</b>		
<i>Splachnum sphaericum</i> (= <i>S. pedunculatum</i> )	(B)	Abel 1956
<b>11. Rhizogoniales</b>		
<i>Pyrrhobryum spiniforme</i> (= <i>Rhizogonium spiniforme</i> )	B	Biebl 1964
<b>12. Diphysciales</b>		
<i>Diphyscium foliosum</i>	(A)	Abel 1956
<b>13. Timmiales</b>		
<i>Timmia austriaca</i>	(A)	Abel 1956
<b>14. Ptychomniales</b>		
No data		
<b>15. Buxbaumiales</b>		
No data		
<b>16. Funariales</b>		
No data		
<b>17. Scouleriales</b>		
No data		
<b>18. Archidiales</b>		
No data		
<b>19. Bryoxiphiales</b>		
No data		
<b>IV. TAKAKIOPSIDA</b>		
<b>1. Takakiales</b>		
No data		
<b>V. SPHAGNOPSIDA</b>		
<b>1. Sphagnales</b>		
No data		
<b>2. Ambuchananiales</b>		
No data		

## ANEXO 2. Efecto de 4 fitohormonas (ABA, BAP, GA<sub>3</sub> e IAA) en la apariencia fenotípica fenotipo de protonemas de *P. patens* (experimento piloto)

Para cumplir con el objetivo número cuatro, se realizó un primer experimento en donde se probaron cuatro fitohormonas a 3 concentraciones diferentes. Las concentraciones para cada hormona fueron seleccionadas en base a la literatura. ABA y BAP: 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  (Thealander *et al.*), GA<sub>3</sub> 1, 10 100  $\mu\text{M}$  (Yasumura Yuki *et al.*, 2007) y la auxina IAA en concentraciones 1,5 y 10  $\mu\text{M}$  como lo mencionan Thealander *et al.* (2005). Los fenotipos obtenidos al concluir los 30 días de monitoreo, evidenciaron que concentraciones de ABA 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  reducen el CE (Fig. A); esta característica es más evidente en concentraciones altas de ABA (10  $\mu\text{M}$ ) provocando inhibición casi total del musgo. Por otro lado, se observó disminución en el CE de los protonemas de *P. patens* sometidos a concentraciones de 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  de BAP, siendo este efecto más pronunciado en la concentración más alta (10  $\mu\text{M}$  BAP) y menos severo en la concentración más baja de BAP 0.1  $\mu\text{M}$  (Fig.B). Al igual que ABA y BAP, GA<sub>3</sub> provocó disminución en el CE en concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ . En la concentración más alta de GA<sub>3</sub> (100  $\mu\text{M}$ ) este efecto fue más severo y se caracterizó por estar acompañado de obscurecimiento de los tejidos (Fig.C). En cuanto a la auxina IAA en concentraciones de 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  se observó de igual forma disminución en CE, este efecto fue más notorio conforme la concentración de IAA aumentó (10  $\mu\text{M}$ ), además que en esta condición se observó obscurecimiento del tejido vegetal (Fig. D).

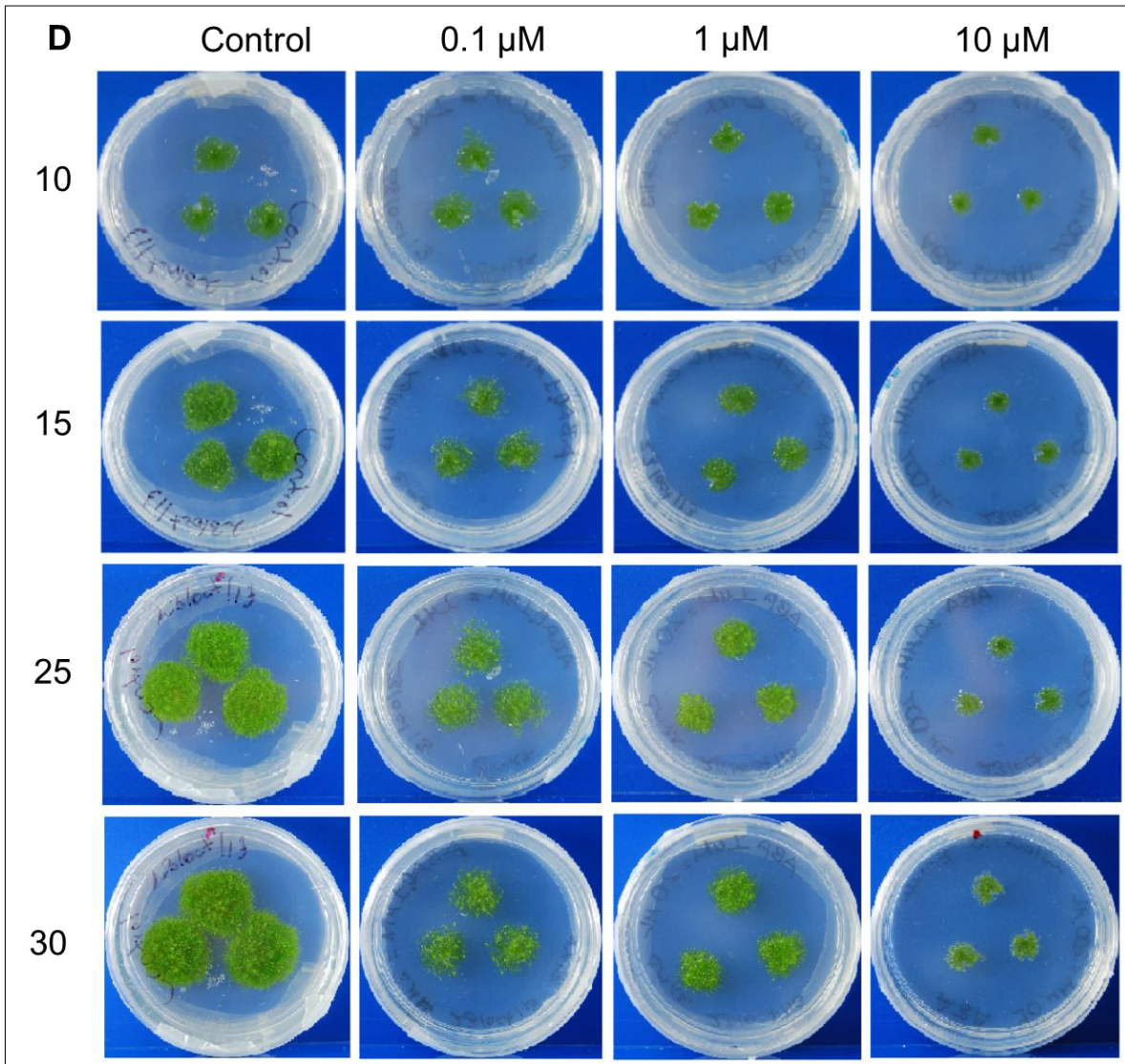


Fig. A Imagen panorámica del desarrollo de los protonemas de *P. patens* sometidos a los tratamientos con ABA por 30 días. D= Días.

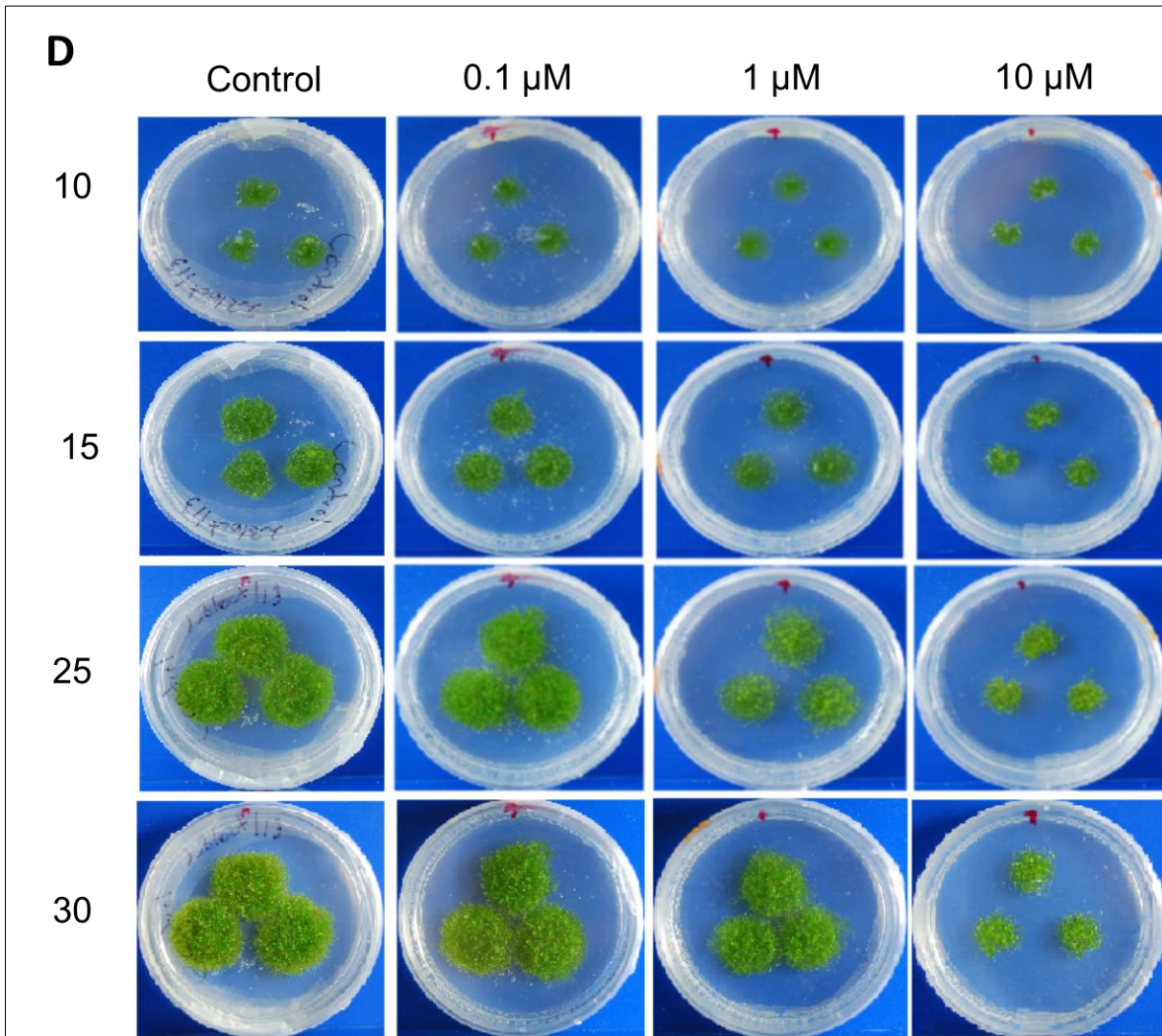


Fig. B Imagen panorámica del desarrollo de los protonemas de *P. patens* sometidos a un pre-tratamiento de 24 hrs con la citocinina BAP, después de 30 días. D= Días

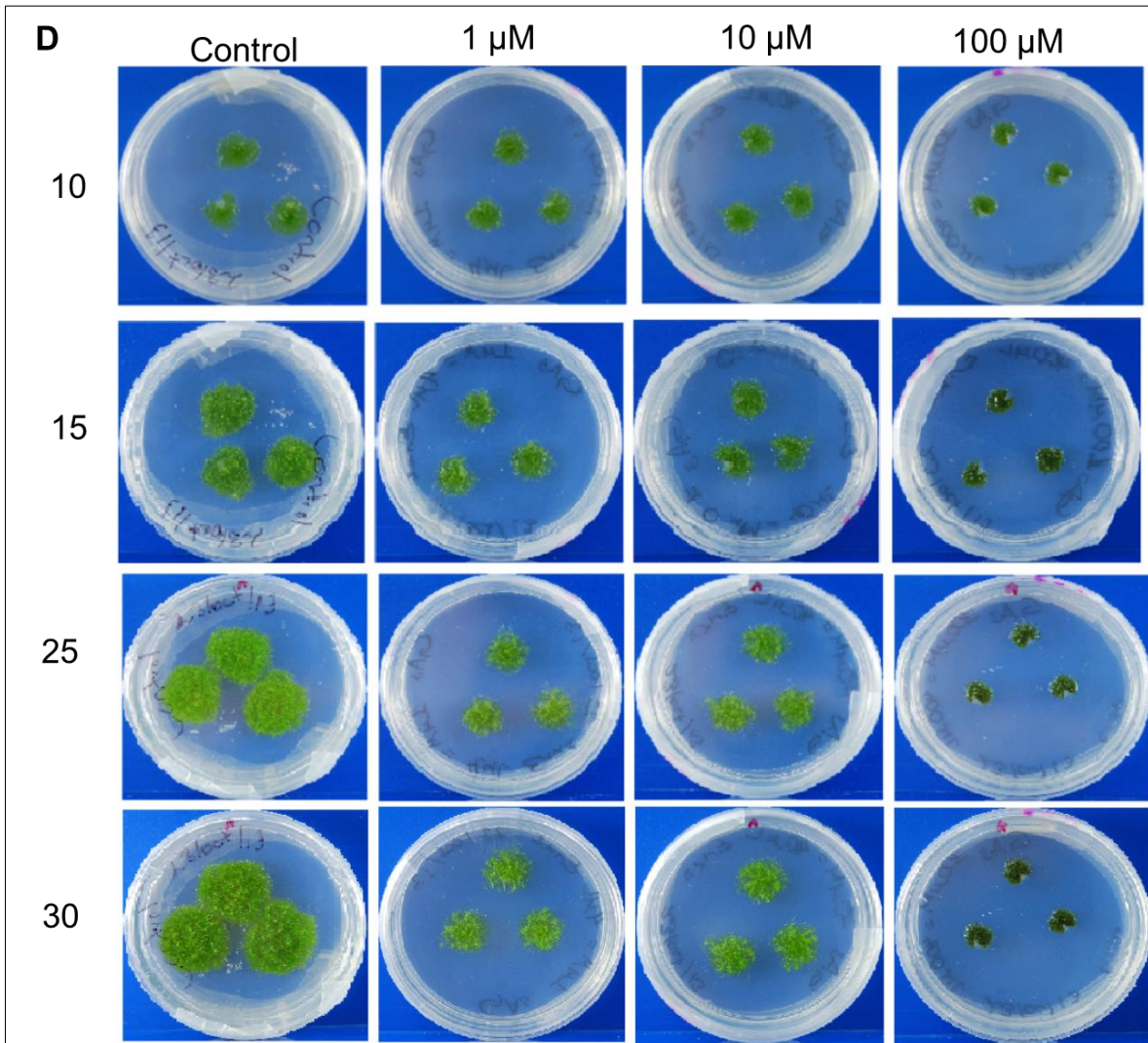


Fig. C Imagen panorámica del desarrollo de los protonemas de *P. patens* sometidos diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub> por 30 días. D= Días

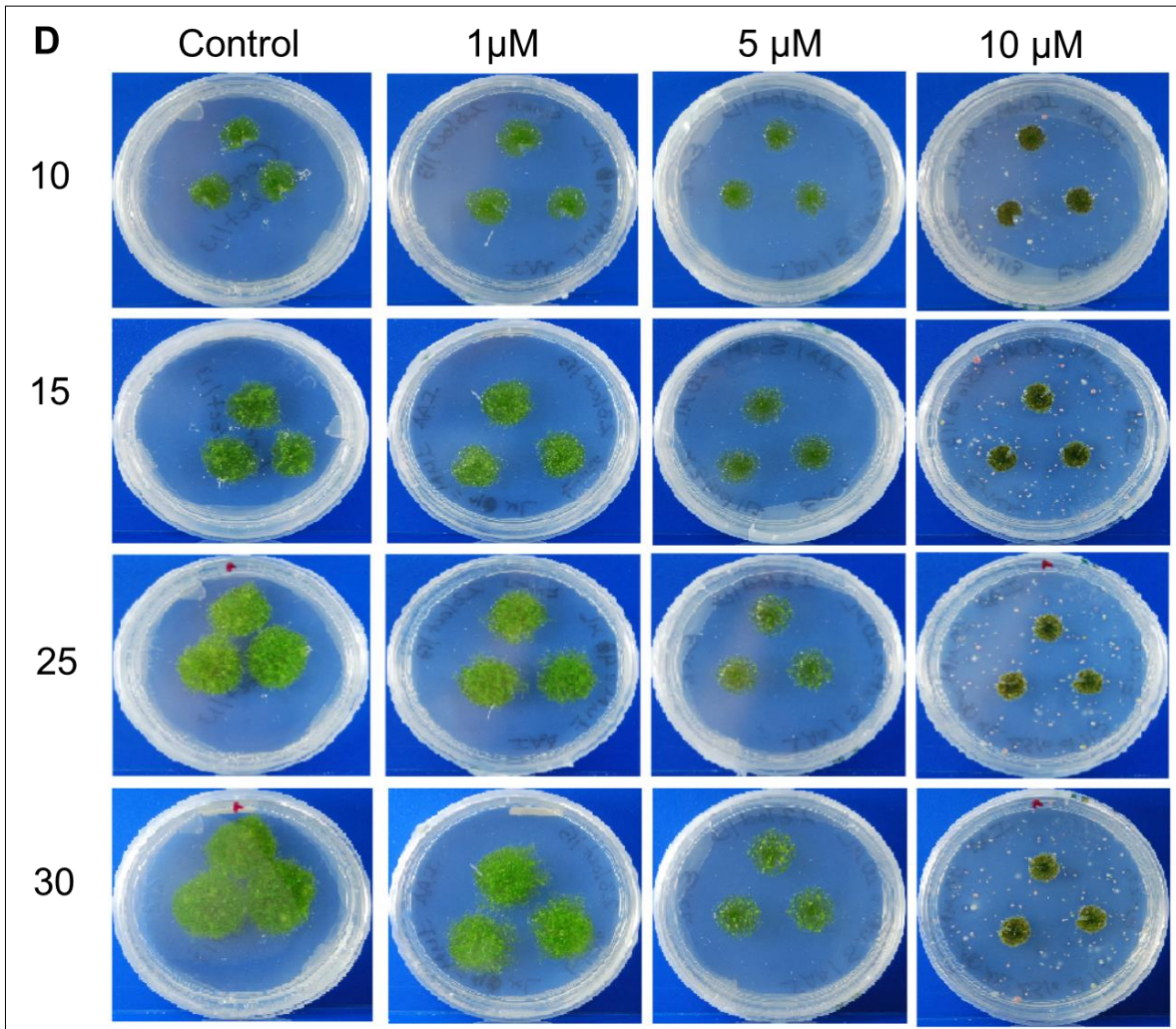


Fig. D Imagen panorámica del desarrollo de los protonemas de *P. patens* sometidos a diferentes concentraciones de IAA después de 30 días. D=Días.

### **ANEXO 3. Efecto de las concentraciones seleccionadas de ABA, BAP, GA<sub>3</sub> e IAA en el CE, número y tamaño de gametóforos en protonemas de *P. patens***

De los resultados del experimento piloto mencionado previamente se eligieron nuevamente las concentraciones de las 4 fitohormonas que reflejaron los mayores cambios fenotípicos en los protonemas de *P. patens*. Se decidió utilizar ABA y BAP 0.1 y 10  $\mu$ M, GA<sub>3</sub> 10  $\mu$ M e IAA 5 y 10  $\mu$ M.

#### **Efecto del ABA en *P. patens***

Las observaciones fenotípicas al cabo de 30 días corroboraron que los tratamientos adicionados con ABA 0.1 y 10  $\mu$ M provocan disminución significativa en el CE (Fig. E y G) del musgo al igual que en el número de gametóforos (Fig. F). Estas características se acentúan más conforme la concentración de ABA aumenta (10  $\mu$ M) donde el desarrollo de los protonemas de *P. patens* se observó significativamente inhibido. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Thealander *et al.*, (2005) en donde el tejido protonemal de *P. patens* de aproximadamente 2 mm de tamaño, fue crecido bajo las mismas concentraciones de ABA (0.1, 1 y 10  $\mu$ M) provocando disminución en el diámetro del musgo e inhibición total del crecimiento y desarrollo del musgo en ABA 10  $\mu$ M. Cabe señalar que este efecto negativo en el crecimiento de los protonemas de *P. patens* es más severo en este trabajo a pesar de que utilizamos la misma especie de briofita. Estas diferencias podrían deberse a que las condiciones de laboratorio en las que se llevaron a cabo ambos experimentos fueron diferentes, desde el medio de cultivo en donde se crecieron los protonemas, intensidad lumínica, tamaño y edad de los protonemas y tipo de propagación de los tejidos.

Con base en tales observaciones se concluyó que concentraciones ABA 0.1 y 10  $\mu$ M poseen un efecto negativo en *P. patens* provocando disminución del crecimiento y en el desarrollo del musgo.

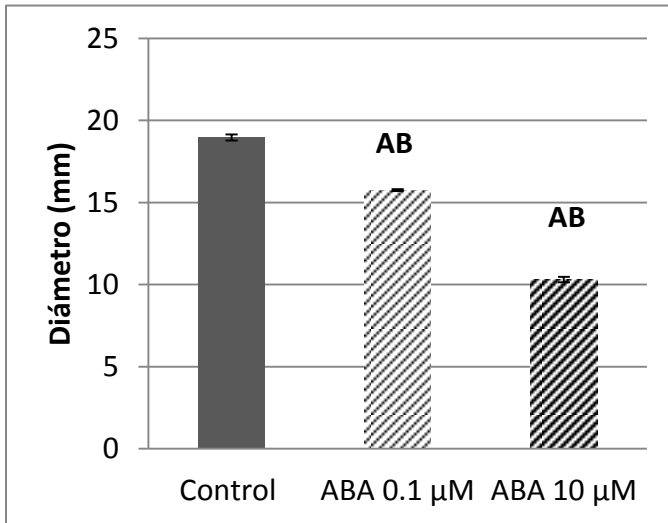


Fig. E CE de los protonemas de *P. patens* sometidos a ABA 0.1 y 10  $\mu$ M durante 30 días. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=9 (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas con otro tratamiento.

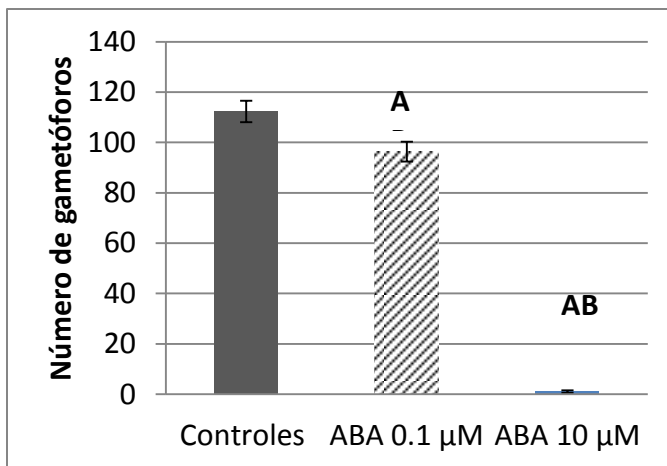


Fig. F Número de gametóforos obtenidos al día de 30 en las diferentes concentraciones de ABA. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas s de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencia significativa respecto a otro tratamiento.  $p= 0.05$

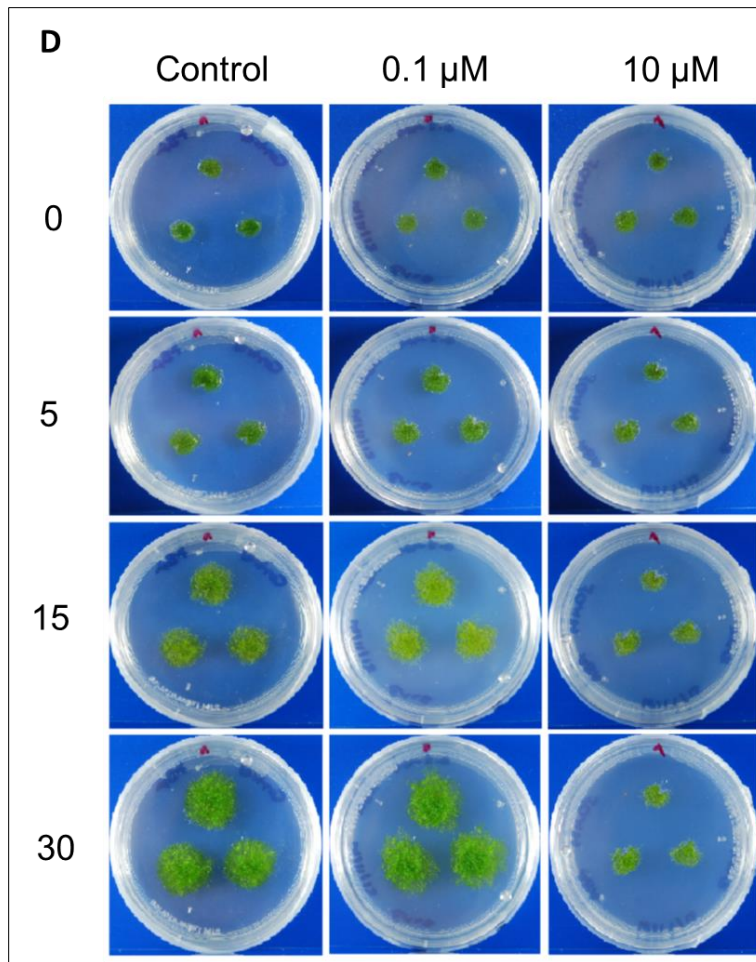


Fig. G Imagen panorámica del de desarrollo de los protonemas de *P. patens* creciendo a diferentes concentraciones de ABA durante 30 días.

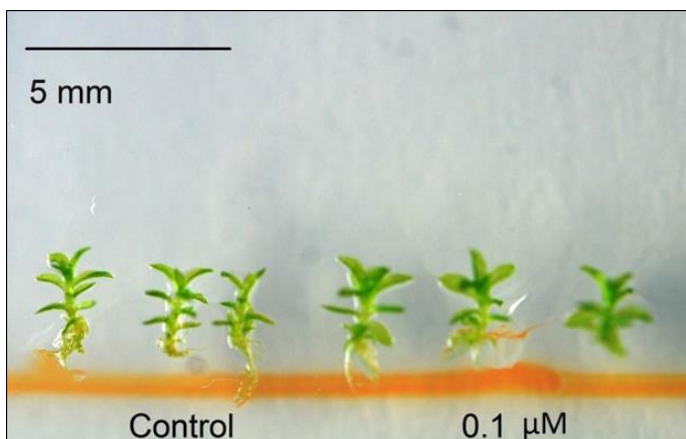


Fig. H Imagen representativa del tamaño y apariencia de los gametóforos a las 30 días en la condición control y ABA 0.1  $\mu\text{M}$

**Efecto de la citocinina BAP en *P. patens***

En cuanto al pre-tratamiento de 24 horas con la citocinina BAP los fenotipos observados fueron que BAP 10  $\mu\text{M}$  provoca reducción significativa en el CE (Fig. I y Fig. J) siendo esta característica claramente observable a partir del día 15. Thealander *et al.*, (2005) también observó que BAP 10  $\mu\text{M}$  causa disminución en el diámetro del musgo, lo cual corrobora nuestros resultados con esta citocinina en donde el CE de *P. patens* disminuyó en presencia de esta citocinina. Así mismo se observó que BAP ocasionó disminución significativa en el número y tamaño de gametóforos (Fig. K) en concentraciones bajas (0.1  $\mu\text{M}$ ) e indujo cambios en la morfología de los filidios en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. L). Nuestros resultados sobre el efecto de la citocinina BAP en la disminución en el número de gametóforos contrastan con estudios hechos con citocininas en *P. patens*, ya que se ha reportado que la citocinina BAP en bajas concentraciones, induce la formación de brotes en *P. patens* (Ashton *et al.*, 1979), lo que sugiere que la concentración de citocinina utilizada en nuestro trabajo no fue la óptima para una mayor formación de brotes y por ende para el crecimiento de gametóforos. Por otro lado se ha reportado que concentraciones entre 5 y 50  $\mu\text{M}$  provocan un crecimiento anormal en los gametóforos, causando filidios más pequeños y tallos más cortos (Ashton *et al.*, 1979). Estos resultados coinciden con el efecto que tuvo BAP en los gametóforos de *P. patens*.

*En base a estos resultados se concluye que en P. patens, la citocinina BAP 10  $\mu\text{M}$  reduce el CE, disminuye la formación de gametóforos y causa cambios en el tamaño y morfología de estos.*

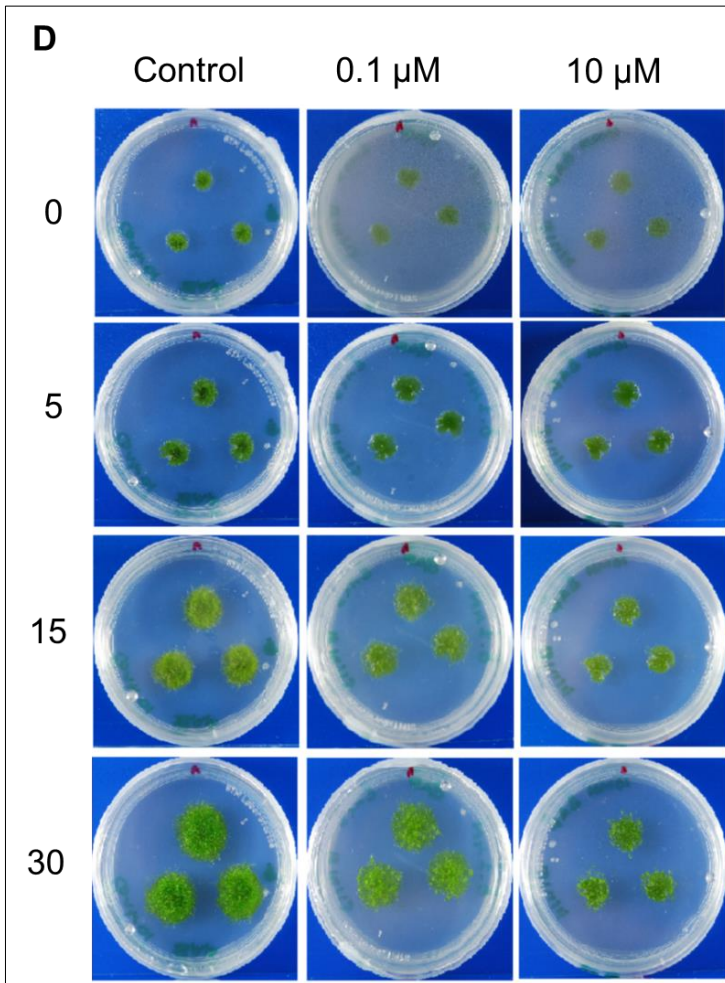


Fig. I Imagen panorámica del día 0 al 30 de desarrollo de los protonemas de *P. patens* creciendo en diferentes concentraciones de BAP. D=Días.

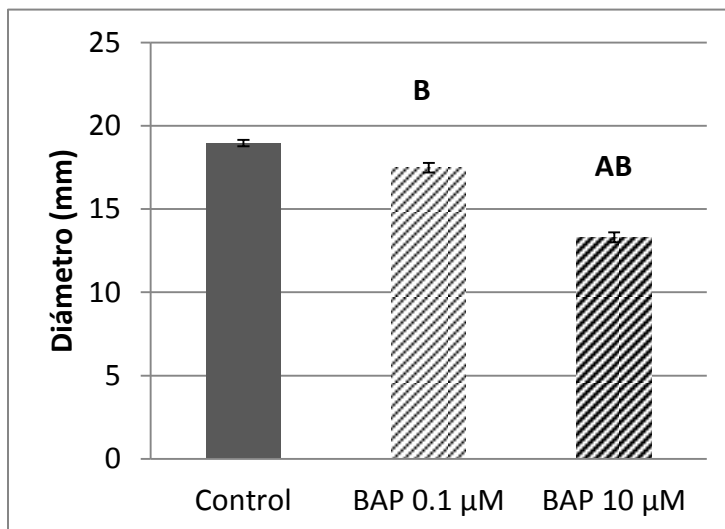


Fig. J CE de los protonemas de *P. patens* sometidos a las diferentes concentraciones de BAP. Se representa la  $\bar{x} \pm \text{ES}$ ,  $n=9$  (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas respecto a otro tratamiento.  $p= 0.05$

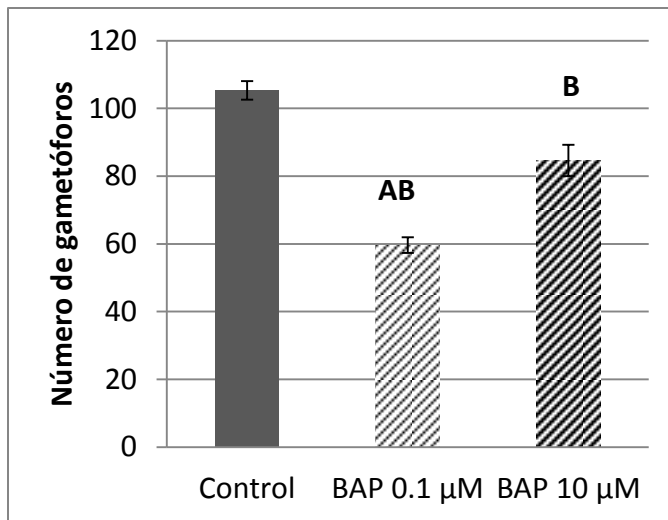


Fig. K Número de gametóforos obtenidos al día de 30 en las diferentes concentraciones de BAP. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ ,  $n=6$  (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas respecto a otro tratamiento.  $p=0.05$

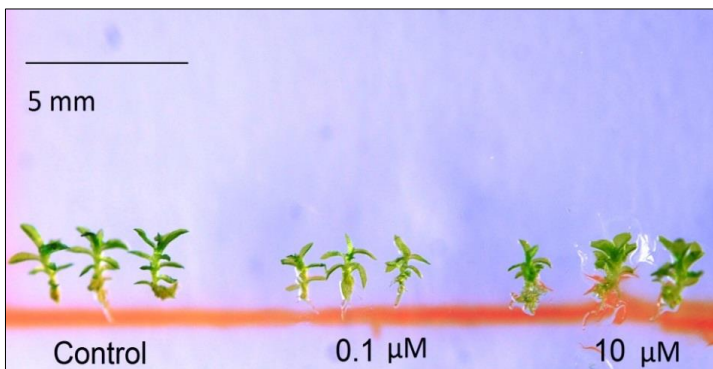


Fig. L Imagen representativa de los gametóforos de *P. patens* a los 30 días en los diferentes tratamientos con la citocinina BAP.

### Efecto de la GA3 en *P. patens*

Al igual que ABA y BAP, se observó una disminución significativa en el CE los protonemas de *P. patens* en presencia de GA<sub>3</sub> 10 μM. (Fig. M y N). Dicha disminución del CE, contrasta con lo reportado en el musgo *B. argenteum* en el cual la giberelina GA<sub>3</sub> a concentraciones de 3 y 10 μM favorece el crecimiento diametral (Sabovljević *et al.*, 2010). Por otro lado, se observó una disminución en el número de gametóforos, aunque no fue significativa (Fig. Ñ). Cabe mencionar que Sabovljević *et al.* (2010) reportan que el índice de formación de brotes en *B. argenteum* aumenta en GA<sub>3</sub> 3 μM y disminuye en concentraciones de 10 μM, lo que coincide con la concepción general de que altas concentraciones fitohormonales tienen efecto represor. Existe muy poca información acerca de los efectos de las GAs en musgos ya que no han sido identificadas químicamente a diferencia de otras fitohormonas (Decker *et al.*, 2006), lo

que dificulta el estudio de estas acerca de sus efectos. En cuanto al tamaño de los gametóforos no se observaron diferencias notables en el tamaño de los gametóforos con respecto al control (Fig. O). Con base en estos resultados se concluye que la giberelina GA<sub>3</sub> posee un efecto negativo en el crecimiento del musgo P. patens.

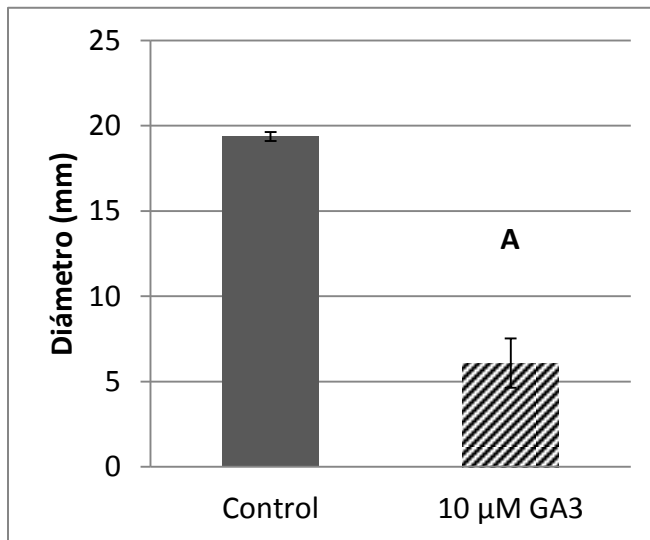


Fig. M CE de los protonemas de *P. patens* sometidos a GA<sub>3</sub> 10 μM durante 30 días. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control.  $p=0.05$

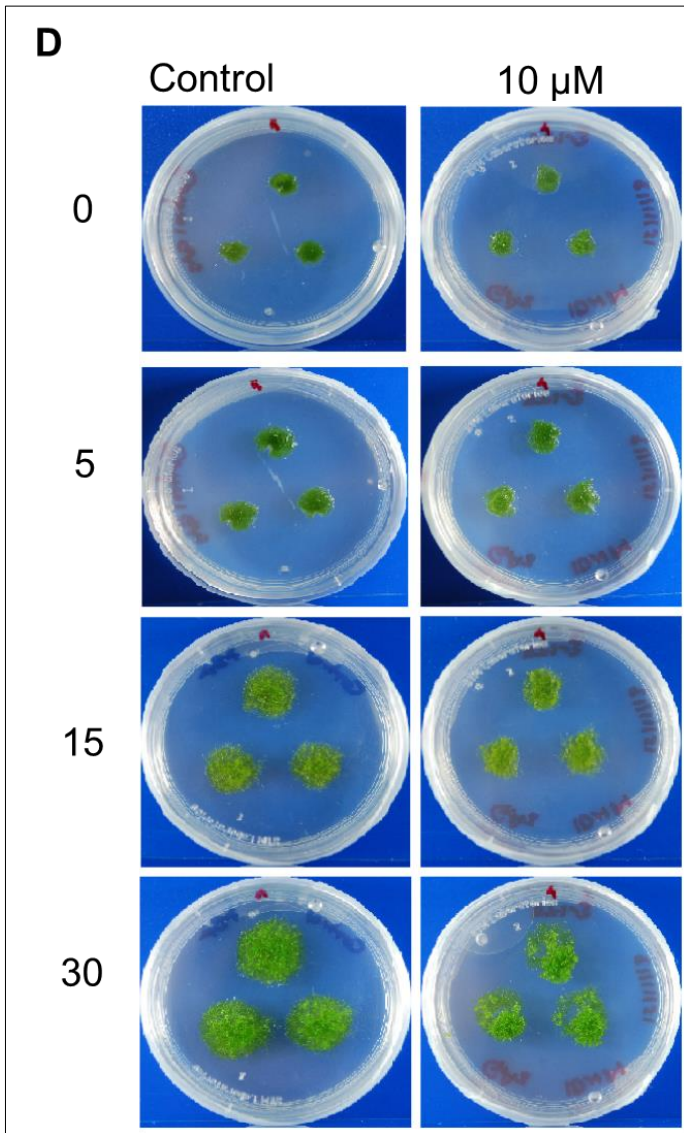


Fig. N Imagen panorámica de desarrollo de los protonemas de *P. patens* creciendo en presencia de GA<sub>3</sub> 10  $\mu$ M durante 30 días. D= Días.

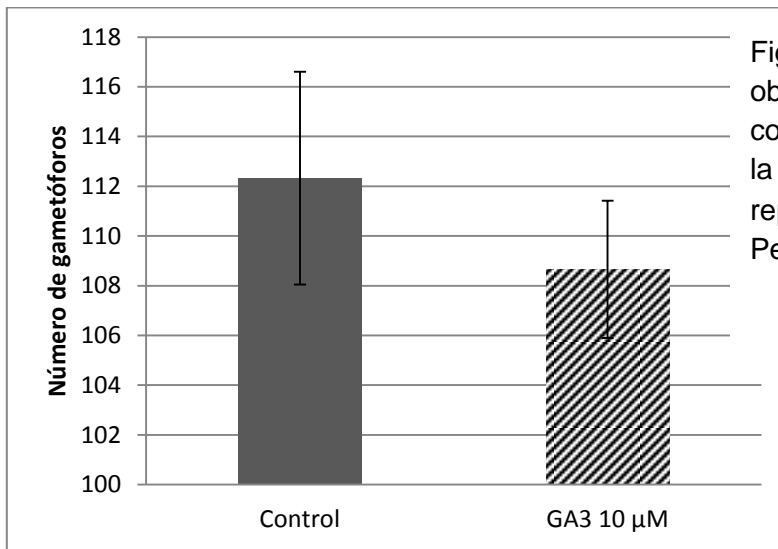


Fig. Ñ Número de gametóforos obtenidos al día de 30 en GA<sub>3</sub> concentración 10 μM. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=3 (membranas representativas de cada caja de Petri de cada experimento). p= 0.05

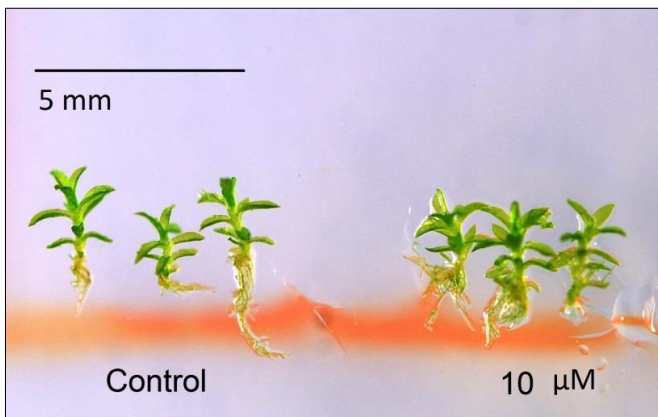


Fig. O Imagen gametóforos representativos crecidos en GA<sub>3</sub> 30 μM al día 30.

### Efecto de la auxina IAA en en *P. patens*

A diferencia de las GAs, las auxinas están presentes en diferentes etapas de desarrollo de los musgos. Se sabe que las auxinas son las encargadas de inducir el paso del cloronema a caulonema en musgos, lo cual dará paso a la formación de brotes (Johri y Desai, 1973). Trabajos como el de Johri y Desai (1973) reportan que en el musgo *F. hygrometrica* IAA 5 μM incrementa en un 81% el número de brotes, en contraste IAA 10 μM origina un 62% de brotes en dicho musgo. Lo reportado por Johri y Desai (1973)

contrasta con nuestros resultados en donde a pesar de que se observó un aumento en el número de gametóforos en adición de IAA 5  $\mu\text{M}$ , no fue estadísticamente significativo (Fig. R) pero el tamaño de los gametóforos fue mayor (Fig. S). Además IAA 5  $\mu\text{M}$  posee un efecto estimulador, provocando un aumento significativo en el CE de *P. patens* (Figs. P y Q). En contraste, IAA 10  $\mu\text{M}$  no tuvo efecto importante en el CE, el número ni tamaño de gametóforos respecto al control. De estos resultados concluimos que IAA en bajas concentraciones (5  $\mu\text{M}$ ) promueve el crecimiento y tamaño de los gametóforos de protonemas del musgo *P. patens*.

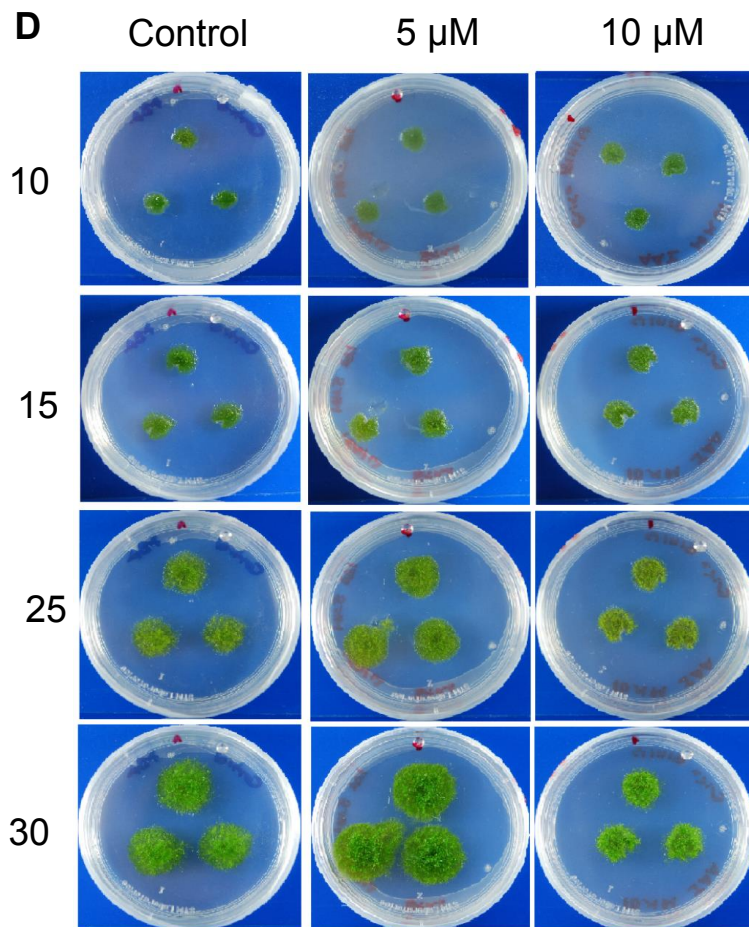


Fig. P Imagen panorámica del desarrollo de los protonemas de *P. patens* creciendo en presencia de 5 y 10  $\mu\text{M}$  durante 30 días. D=Días.

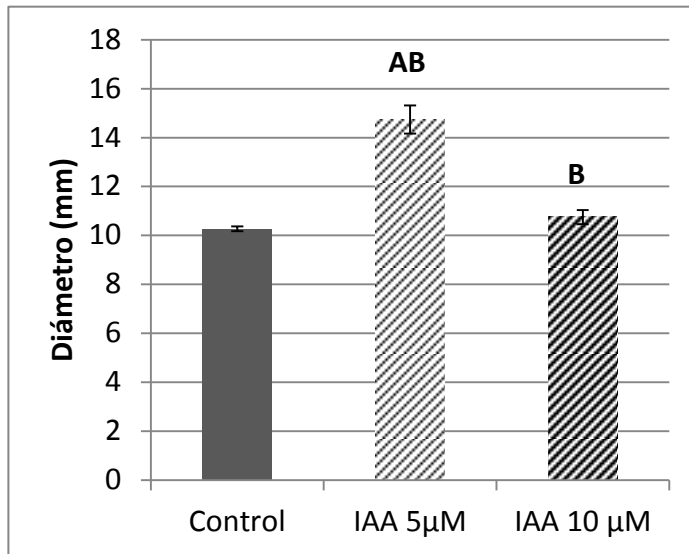


Fig. Q CE de los protonemas de *P. patens* sometidos a IAA 5 y 10 µM durante 30 días. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=9 (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento). A: Diferencias significativas respecto al control. B: Diferencias significativas respecto a otro tratamiento. p= 0.05

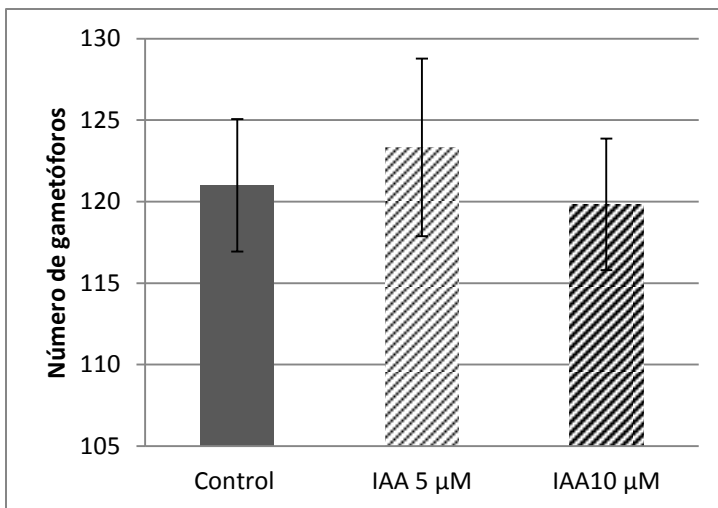


Fig. R Número de gametóforos obtenidos al día 30 en protonemas de *P. patens* creciendo a IAA 5 y 10 µM. Se representa la  $\bar{x} \pm ES$ , n=6 (membranas representativas de cada caja de Petri independiente de cada experimento) p= 0.05

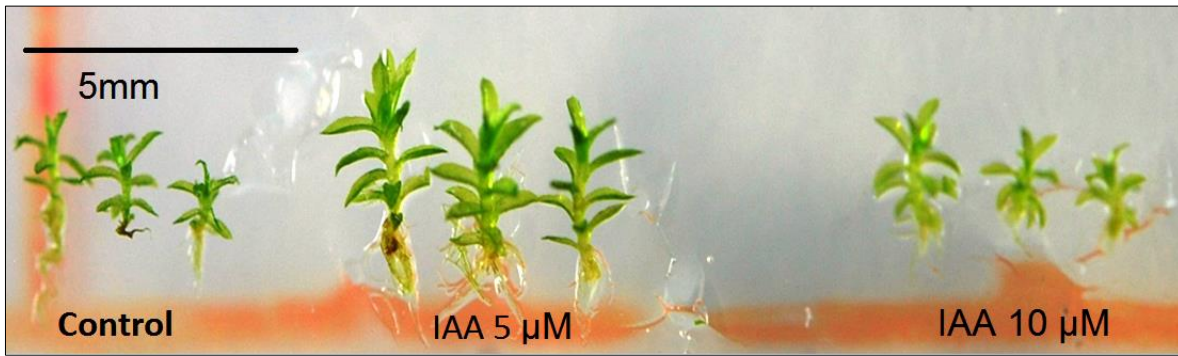


Fig. S Imagen representativa de la apariencia de los gametóforos de *P. patens* en los diferentes tratamientos con la auxina IAA, transcurridos 30 días.