

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Dinámicas transcripcionales y fisiológicas de la respuesta a déficit hídrico progresivo en gulupa

PAULA ANDREA LOZANO MONTAÑA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2022

Dinámicas transcripcionales y fisiológicas de la respuesta a déficit hídrico progresivo en gulupa

PAULA ANDREA LOZANO MONTAÑA

Tesis presentada para optar por el título de
Magister en Ciencias - Biología

Directores

Felipe Sarmiento Salazar Ph. D., Biólogo
Luz Marina Melgarejo Muñoz Ph. D. Bióloga

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2022

la caja,
la obscena corrupción y la mortaja,
los ritos de la muerte y las endechas.

Borges

Declaración de obra original

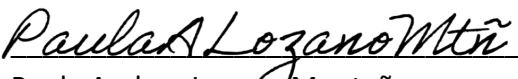
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.


Paula Andrea Lozano Montaña

07/10/2022

Agradecimientos

A la DIEB de la Universidad Nacional de Colombia por el financiamiento otorgado al proyecto “Recursos bioinformáticos para el cultivo de gulupa en la postpandemia: Ensamblaje de novo del transcriptoma de *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* durante la respuesta temprana ante el estrés por déficit hídrico.” Con código Hermes 51136, del cual hace parte esta tesis de maestría. Y a la Facultad de Ciencias por el examen Eficiencias, por el cual obtuve la Beca de Auxiliar Docente que me permitió realizar esta maestría.

Al profesor Felipe Sarmiento por la dirección de este trabajo, por su guía constante y apoyo incondicional, cuestionando todo y siempre dispuesto a enseñar y a aprender, por ser un gran profesor y amigo, y por siempre responder a mis gritos de ayuda, incluso desde el otro lado del Atlántico. A la profesora Luz Marina Melgarejo por su apoyo y confianza en mí, por su importante aporte a la integridad de este proyecto, y por ser mi modelo a seguir como mujer en ciencia.

Al grupo de Investigación en Biología Computacional, especialmente a la profesora Clara Bermúdez, por su guía y ayuda en la parte bioinformática, por escucharnos y enseñarnos lo mayor posible, también al señor Ernesto Parra por su colaboración, así como a Martin Guacaneme.

Al grupo de Investigación de Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos, por acogerme estos últimos años y enseñarme todo lo que ha podido, a mis compañeras Tannia y Carolina por compartir conmigo el proceso de la tesis y apoyarnos mutuamente. A los demás integrantes del grupo por sus críticas y aportes para sacar adelante este proyecto. Así como a los integrantes del grupo de Investigación Ingeniería Genética en Plantas. A Victoria Gómez y Nicolas Arnaud, por su disposición y guía durante mi pasantía, a Pauline y todos los integrantes del IJPB, INRAE en Francia por enseñarme tanto y mostrarme la ciencia desde una nueva perspectiva.

A mi hermana Lina por ser ella y ser la mujer más inteligente, hacerme querer ser mejor y un poco más parecida a ella cada día. A mi mamá por todo el apoyo y no dudar de mis decisiones pese a no entenderme siempre, sin ella no habría camino para andar. A mi papá en la distancia de un universo desconocido o de mi memoria, te extraño todos los días. Los amo infinitamente.

A Helena, también en mi memoria. A mis amigos por acompañarme, escucharme, entenderme, ayudarme, despedirme y recibirme, las veces que sea necesario.

Resumen

Dinámicas transcripcionales y fisiológicas de la respuesta a déficit hídrico progresivo en gulupa

El cambio climático, especialmente de la escasez de agua, ha tenido dentro de sus consecuencias, algunas devastadoras para la agricultura en los últimos 50 años; amenazando directamente la seguridad alimentaria de las comunidades involucradas en producción de alimentos y demás consumidores. Para el siglo 21 se espera un aumento de la sequía en distintas zonas del mundo, resultado de un aumento de la evapotranspiración, acompañado de una reducción en la precipitación. En la zona Andina su efecto se ha visto principalmente en el retroceso acelerado de los glaciares, que proveen de agua a los sistemas agrícolas circundantes, por lo que se espera una disminución en la capacidad de abastecimiento hídrico de las comunidades andinas y de sus sistemas agrícolas. Colombia es un país que está intentado posicionarse en exportaciones agrícolas pero debido a eventos climáticos como el déficit hídrico, muchos de estos cultivos se ven amenazados. Dentro de estos se encuentra el cultivo de gulupa o fruta de la pasión (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*), fruta cuya exportación ha crecido considerablemente en la última década, generándole entradas económicas al país anuales alrededor de los 35 millones de dólares. Este cultivo al verse enfrentado a cambios en las condiciones de riego puede reducir su crecimiento y comprometer su producción, es por eso que realizar estudios sobre su respuesta frente al estrés por déficit hídrico es necesario, además de seguir profundizando en los mecanismos de respuesta de las plantas frente a la escasez de agua en búsqueda de posibles soluciones. Es por esto por lo que se planteó el objetivo de analizar la respuesta fisiológica y transcriptómica de gulupa frente al déficit hídrico. Se midieron variables fisiológicas como: conductancia estomática (gs), temperatura foliar (Tf), contenido de fotopigmentos, fluorescencia de la clorofila a y reflectancia foliar, de donde se encontró una respuesta con rasgos de evitación, así como con rasgos de tolerancia, en donde en búsqueda de mantener las condiciones hídricas se sacrifican procesos como el crecimiento. Por otra parte, y con ayudas de herramientas de secuenciación de nueva generación, se obtuvo una lista de genes diferencialmente expresados de las plantas sometidas a déficit. Los cambios en la expresión que se generan participan en la modulación de distintos procesos en toda la planta, principalmente relacionados con señalización mediada por ABA, crecimiento, el sistema antioxidante. Estos procesos se reportan dentro de los rasgos asociados a la tolerancia al estrés. Entender los distintos mecanismos de respuesta y poder integrar los distintos niveles, moleculares, bioquímicos y fisiológicos, es una propuesta actualmente muy utilizada para alimentar las bases de los programas de mejoramiento, de esta manera protegiendo la seguridad alimentaria.

Palabras clave: déficit hídrico; conductancia estomática; expresión diferencial; ABA; ROS.

Summary

Transcriptional and physiological dynamics of the response to progressive water deficit in gulupa.

Climate change, especially water scarcity, has had some devastating consequences for agriculture in the last 50 years, directly threatening the food security of communities involved in food production and other consumers. For the 21st century, an increase in drought is expected in different areas of the world, because of an increase in evapotranspiration, accompanied by a reduction in precipitation. In the Andean zone, its effect has been seen mainly in the accelerated retreat of glaciers, which provide water to the surrounding agricultural systems, so a decrease in the water supply capacity of Andean communities and their agricultural systems is expected. Colombia is a country that is trying to position itself in agricultural exports, but due to climatic events such as the water deficit, many of these crops are threatened, including the gulupa or passion fruit (*Passiflora edulis* Sims *f. edulis*), a fruit whose export has grown considerably in the last decade, generating annual economic income for the country of around US\$35 million. This crop, when faced with changes in irrigation conditions, can reduce its growth and compromise its production, which is why it is necessary to conduct studies on its response to water stress, as well as to continue delving into the mechanisms of plant response to water scarcity in search of possible solutions. For this reason, the objective was to analyze the physiological and transcriptomic response of gulupa to water deficit. Physiological variables such as stomatal conductance (g_s), leaf temperature (T_f), photopigment content, chlorophyll fluorescence, and leaf reflectance were measured, from which a response with avoidance traits was found, as well as tolerance traits, where processes such as growth are sacrificed in the search to maintain water conditions. On the other hand, a list of differentially expressed genes of plants subjected to deficit was obtained with the aid of new-generation sequencing tools. The change in expression participates in the modulation of different processes in the whole plant, mainly related to ABA-mediated signaling, growth, and the antioxidant system. These processes are reported within the traits associated with stress tolerance. Understanding the different response mechanisms and being able to integrate the different molecular, biochemical, and physiological levels is a widely used breeding program approach, thus protecting food security.

Keywords: water deficit; stomatal conductance; differential expression; ABA; ROS.

Tabla de contenido

Introducción	15
Marco teórico.....	16
Cambio climático.....	16
Estrés en plantas.....	17
Respuesta al déficit hídrico.....	18
Nivel molecular.....	18
Nivel bioquímico.....	19
Nivel fisiológico.....	20
<i>Passiflora edulis</i> Sims. f. <i>edulis</i>	25
Estudios moleculares en Gulupa.....	27
Transcriptómica.....	28
Objetivos.....	31
Capítulo 1	32
Abstract.....	32
Resumen.....	32
Introducción.....	34
Metodología.....	36
Resultados.....	38
Discusión.....	53
Conclusiones.....	61
Capítulo 2	62
Abstract.....	62
Resumen.....	62
Introducción.....	63
Metodología.....	65
Resultados.....	68
Discusión.....	80
Conclusiones.....	88
Anexos.....	89
Bibliografía.....	91

Lista de figuras

- Figura 1. Plantas de gulupa bajo control (a), reducción del 50% del riego (b) y reducción total del riego (c) durante 40 días. Tomado de (Lozano-Montaña et al., 2021)
- Figura 2. Planta de gulupa con flor y fruto.
- Figura 3. Cambios en la conductancia estomática (gs) a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.
- Figura 4. Cambios en la temperatura foliar (Tf) a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.
- Figura 5. Cambios en el Contenido relativo de clorofila (CC) a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.
- Figura 6. Cambios en el contenido de Clorofila a (mg/g PF), a los 0, 5 y 10 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.
- Figura 7. Cambios en el contenido de Clorofila b (mg/g PF), a los 0, 5 y 10 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.
- Figura 8. Cambios en el contenido de Clorofilas totales (mg/g PF), a los 0, 5 y 10 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.
- Figura 9. Cambios en el contenido de Carotenoides (mg/g PF), a los 0, 5 y 10 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.

- Figura 10. Cambios en la Eficiencia cuántica del PSII (F_v/F_m), a los 0, 5 y 10 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.
- Figura 11. Cambios en el índice de desempeño (P_iABS), a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0.05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.
- Figura 12. Diagrama de barras de los valores propios para el Análisis de componentes principales con las variables asociadas a la fluorescencia de la clorofila.
- Figura 13. PCA (Análisis de componentes principales) de los individuos con agrupación por tratamiento para cada punto de muestreo.
- Figura 14. Curva OJIP (Intensidad fluorescencia vs logaritmo del tiempo (ms)). Los valores son el promedio de 5 individuos por tratamiento. A. ddt5, B. ddt 5, C. ddt 10 y D. ddt 15.
- Figura 15. Huella espectral de plantas de gulupa dentro del rango de longitudes de onda de 450 a 2500 nm. Cada curva corresponde al promedio de 5 individuos para el último punto de muestreo (ddt 15).
- Figura 16. Cambios en el Porcentaje de humedad en suelo a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de tratamiento de déficit hídrico. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.
- Figura 17. Gel de electroforesis de las muestras usadas para secuenciación.
- Figura 18. PCA sobre las librerías utilizadas en la tabla de conteo para el análisis de expresión diferencial
- Figura 19. MAplot (Media de conteos normalizados entre tratamientos en el ddt 5 vs log Fold change)
- Figura 20. Comparación de conteos normalizados entre tratamientos (c =control y e= estrés) para el ddt 5, de los 4 genes con menor valor p.
- Figura 21. MAplot (Media de conteos normalizados entre tratamientos en el ddt 10 vs log Fold change)
- Figura 22. Comparación de conteos normalizados entre tratamientos (c =control y e= estrés) para el ddt 10, de los 4 genes con menor valor p.
- Figura 23. Diagrama de Venn comparando las listas de genes diferencialmente expresados (GDE) del ddt 5 y 10.

Lista de tablas

- Tabla 1. índices de vegetación (Vis)*
- Tabla 2. Resultados para índices de vegetación (Vis) para el ddt 15*
- Tabla 3. Calidad de muestras enviadas a secuenciación*
- Tabla 4. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en el ddt 5 para genes con LFC < -1*
- Tabla 5. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en el ddt 5 para genes con LFC >1*
- Tabla 6. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en el ddt 10 con LFC <-1.*
- Tabla 7. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en el ddt 10 con LFC >1.*
- Tabla 8. Cantidad de categorías enriquecidas según dcGO para cada punto de muestreo.*

Introducción

La escasez de agua es uno de los retos más relevantes del siglo XXI a los que se está viendo sometida la humanidad. Las zonas áridas en el mundo ocupan un 40% del territorio terrestre y de este porcentaje 25% corresponde a áreas de cultivo; de igual forma, el 36% de la población mundial vive en áreas con escasez de recursos hídricos (Safriel et al., 2005). La agricultura es la actividad industrial con mayor consumo de agua fresca, siendo casi el 90% en algunas regiones (Hoekstra & Mekonnen, 2012). Se ha pronosticado que para el año 2030 el uso de agua anual rondará los 6.9 trillones de metros cúbicos, lo que equivale al doble de la capacidad de las fuentes hídricas actuales (Gilbert & McLeman, 2010).

El impacto del calentamiento global no es ajeno al sector agrícola, la frecuencia de eventos extremos ha aumentado, lo que agrava la sequía y reduce la cantidad de agua disponible para los cultivos (Cai et al., 2021). En Colombia, se espera que las precipitaciones en varias partes del país se vean afectadas. En las regiones áridas (21,5% del país) las precipitaciones disminuirán; mientras que en otras partes del país las precipitaciones mostrarán una tendencia ascendente, lo que tendrá un impacto grave en las dinámicas agrícolas (Posada & Posada, 2007).

Muchos esfuerzos se están haciendo para hacerle frente a las distintas consecuencias que acarrea el calentamiento global (Sposito et al., 2013). Los períodos de sequía de los últimos años han mostrado la necesidad de estudiar la tolerancia de los cultivos a la escasez de agua, por lo que realizar investigación en búsqueda de potencial adaptativo y explicar mecanismos de respuesta de las plantas al déficit hídrico es de suma importancia.

El cultivo de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) ha cobrado gran importancia en Colombia. Actualmente ocupa el tercer lugar entre las frutas de exportación y al cierre de 2019 generó alrededor de 36 millones de dólares en ingresos, y se ha convertido en la segunda pasiflora más vendida con una producción total de 9.000 toneladas (Gioppato et al., 2019). Este cultivo además es considerado como un sustituto de los cultivos ilícitos en la actual situación de posconflicto. Pero a pesar del auge de los negocios, la información disponible de este cultivo es poca y ésta es necesaria (Lozano-Montaña et al., 2021).

En este trabajo se estudió la respuesta de plantas de Gulupa al déficit hídrico progresivo, reportando cambios a nivel fisiológico y transcripcional. Generando nuevos recursos, incluyendo genes candidatos involucrados en los mecanismos de respuesta de la estrategia de resistencia de estas plantas a la baja disponibilidad hídrica.

Marco teórico

Cambio climático

Desde finales del siglo XIX con el seguimiento continuo de las estaciones meteorológicas en diversas regiones de la tierra, se ha observado un aumento en la temperatura de manera generalizada, principalmente desde 1980. Esto va de la mano con los diferentes procesos de industrialización de los países, que ha provocado un aumento del CO₂ en la atmósfera y en consecuencia la acumulación de gases efecto invernadero (Caballero et al., 2007).

Los términos "cambio climático" y "calentamiento global" deben entenderse como conceptos diferentes. El primer concepto se refiere a todos los cambios climáticos que han ocurrido en la historia de la tierra, principalmente relacionados con la actividad solar, la circulación oceánica y las actividades volcánicas o geológicas. El segundo concepto se debe comprender desde la influencia que ha tenido el aumento de la temperatura de la tierra en los últimos 150 años, que se atribuye a los efectos de las actividades humanas, como la quema de combustibles fósiles y la deforestación (Caballero et al., 2007).

Infortunadamente, el calentamiento global ha tenido graves consecuencias en la distribución y abundancia de especies determinadas por factores climáticos, y es que al verse afectados los patrones normales de estos factores se ha provocado pérdidas en la biodiversidad, amenazando a la población humana y a la seguridad alimentaria, generando inundaciones, escasa disponibilidad de agua y aumento en la aparición y transmisión de enfermedades (Vitousek, 2015; Wilke et al., 2019).

Su impacto en la seguridad alimentaria es importante, pues cuando se ven modificados los patrones de lluvia y temperatura, los cultivos se ven comprometidos, lo que también se traduce en una reducción en el suministro de alimentos para la población humana. Se estima que al menos cuatro de los cultivos importantes en el mundo: el trigo, el maíz, la soja y el arroz tengan una disminución progresiva en los próximos años, lo que va a estar directamente relacionado con el aumento en la frecuencia y duración de las temperaturas extremas y los cambios en patrones de precipitación (Ostberg et al., 2018).

Como en otras partes del mundo, el cambio climático en Colombia es innegable; en el país se ha reflejado principalmente en la disminución paulatina del área glaciaria, la que se ha ido desapareciendo entre 5 cm y 1 m de espesor por año; además que, en los últimos 50 años, el nivel del mar ha cambiado de 3 a 5 mm por año, aumentando más de 10 cm en el Caribe y más de 22 cm en el Pacífico (Posada & Posada, 2007).

Rodríguez et al. (2015), realizaron una estimación de la influencia del cambio climático para los ecosistemas de páramo en Colombia. Aquí se encontró que se tendrá una reducción del 97% por el aumento en la altura del piso térmico a partir del cual se encuentra. A su vez reportó que, debido al aumento de la temperatura, los bosques de niebla se verán afectados por la poca formación de nubes y su influencia directa en la humedad relativa del ecosistema. Además, con el incremento acelerado de la temperatura media en los Andes, el retroceso de los glaciares es sumamente preocupante, pues afecta directamente los sistemas agrícolas circundantes que dependen de estos como fuente de agua (Ponce, 2020). Paulatinamente se verá una disminución del abastecimiento de agua en las comunidades andinas lo que llevará a una baja en el rendimiento de los cultivos (Lozano-Povis et al., 2021).

Estrés en plantas

El término estrés se deriva de la física experimental, siendo definido como el evento al que se ve sometido un objeto tras tener contacto con una fuerza externa, en esta situación el objeto entrará en estrés, y si esta fuerza es mayor que la resistencia del objeto se deformará o romperá. El término estrés se ha utilizado en biología, donde se conoce como la falta de condiciones óptimas para que un individuo se desarrolle plenamente, causando daños en la estructura del individuo (Amrhein et al., 2013).

El daño irreversible también puede entenderse como un factor externo que tiene un impacto negativo sobre los organismos, en este caso sobre las plantas, que están sometidas a estrés tanto en entornos naturales como en condiciones controladas y dependiendo del tipo de estrés se clasifican en abióticos o biótico. El primer tipo puede ser por exposición a altas o bajas temperaturas, a exceso o falta de agua, a falta de nutrientes en el suelo o a alta radiación. Mientras que el segundo tipo se relaciona más con el ataque de insectos, de otros herbívoros y de patógenos como bacterias y virus (Taiz & Zeiger, 2006).

La escasez de agua es uno de los estreses más importantes enfrentados por las plantas, ya que esta ocasiona al menos el 40% de la pérdida global de cultivos, posicionándose como una fuerte amenaza para la seguridad alimentaria (Fàbregas & Fernie, 2019); y debido a las dinámicas actuales del cambio climático y su influencia en el aumento progresivo en la escasez de agua, el estrés por déficit hídrico es una amenaza creciente (Harb et al., 2010).

Debido a la naturaleza inmóvil de las plantas se desarrollaron mecanismos específicos de adaptación para hacer frente al estrés a corto y largo plazo, relacionados con cambios

anatómicos, morfológicos, celulares, bioquímicos y moleculares (Taiz & Zeiger, 2006); y de la interacción de todos estos mecanismos se genera la resistencia al estrés.

Respuesta al déficit hídrico

Para la respuesta a este estrés se conocen distintas rutas. Se ha descrito la ruta de escape como aquella que se caracteriza por completar el ciclo de vida antes de que el estrés se vuelva muy amenazante. Por otra parte, están los mecanismos de resistencia, el primero, la ruta de evitación que busca minimizar el impacto del estrés en el organismo, maximizando la absorción de agua o minimizando la pérdida de esta; y finalmente, la ruta de tolerancia que mantiene las relaciones hídricas constantes pese a la escasez de agua (Harb et al., 2010).

La respuesta de las plantas al estrés varía según la intensidad, duración y tipo de estrés (Amrhein et al., 2013), y depende de cambios a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular para afrontar al estrés (Kusvuran & Dasgan, 2017).

Nivel molecular

En la respuesta al estrés hay una reprogramación transcripcional, que lleva a la activación o supresión de genes conocidos como de respuesta, junto con la interacción entre genes o entre proteínas. La mayoría de los estudios transcripcionales durante el estrés en plantas se han realizado en *Arabidopsis thaliana*. En esta planta se ha descrito la participación de los factores de transcripción (TF) como reguladores de la expresión génica en los sistemas biológicos durante la respuesta a estrés dentro de distintas vías metabólicas (Rolly et al., 2021).

Gracias a los estudios con RNA-seq y con los avances en bioinformática se ha acelerado el descubrimiento de genes de respuesta a estrés en muchas plantas. En el caso del déficit hídrico se sabe que la fitohormona ABA tiene un papel fundamental, iniciando la cascada de señalización al unirse a proteínas receptoras (PYL/PYR/RCARs) que inhiben fosfatasa (PP2Cs); esta interacción libera proteínas quinasas que fosforilan factores de transcripción como ABRE, que inician una regulación de la expresión que llevan a la respuesta al estrés en caminos como el cierre estomático o la dormancia de semillas (Vanwallendael et al., 2019).

Pese a que muchos genes de respuesta a estrés están involucrados en la vía de respuesta dependiente de ABA, existe otra vía de respuesta que es independiente de ABA (Shinozaki

& Yamaguchi-Shinozaki, 2007). La regulación de estos genes ocurre a través de DRE (Dehydration responsive element) y CRT (elementos de acción cis con repeticiones C) en acción conjunta con DREB (proteína de unión a DRE) o los factores de transcripción CBF (Factor de unión) (Niu et al., 2018). Aparte se conocen factores de transcripción como MYB/MYC, NAC y WRKY, que desempeñan un papel importante en mediar la regulación de genes de respuesta a estrés independientes de ABA (Hu et al., 2006).

Incluso, se han realizado estudios que revelan la compleja relación entre los caminos dependientes e independientes de ABA, existiendo un tipo de corregulación (Nakashima et al., 2009; Yoshida et al., 2015). Componentes esenciales de la señalización por ABA como las SnRK2s (Proteínas quinasas relacionadas con SNF1) participan en la convergencia entre los dos caminos anteriormente mencionados, regulando la expresión de genes dependientes de ABA y de DREB bajo las condiciones de déficit hídrico (Fujita et al., 2005).

Por otra parte, se han realizado estudios mostrando la interacción entre proteínas dependientes de ABA como AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 y ABF3 con proteínas independientes de ABA como DREB2A, DREB1A, DREB2C (Morimoto et al., 2013; Seo et al., 2011). Así como la interacción física entre factores de transcripción dependientes de ABA como ABF2 y ABF4 con genes de vías independientes de ABA (Xu et al., 2015). Por lo que es de suma importancia juntar estudios de secuenciación de RNA con el análisis de redes de interacción para entender la relación entre los caminos dependientes e independientes de ABA (Xue et al., 2021).

Nivel bioquímico

Las cascadas de señalización activan o inhiben distintos procesos metabólicos. Dentro de estos procesos se genera una respuesta al desequilibrio osmótico provocado por la falta de agua (Rivas-Ubach et al., 2012), las plantas invierten en la acumulación de solutos orgánicos e inorgánicos en el citoplasma, entre los que se encuentran algunos aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos y distintos tipos de carbohidratos solubles (Suseela et al., 2015). Este ajuste osmótico celular depende de la intensidad del estrés en cuestión, y desempeña un papel importante en la respuesta al déficit hídrico, siendo utilizadas como moléculas señal, además de tener capacidad protectora de la estructura de proteínas y de estabilizar la membrana evitando el daño oxidativo (Ashraf & Foolad, 2007).

El desbalance producido a nivel celular por la respuesta a estrés genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son el resultado del metabolismo del oxígeno en las células (Greenham et al., 2017). Las ROS suelen estar en bajas

concentraciones y tienen función como moléculas señalizadoras activando la transcripción de diferentes genes; sin embargo, en condiciones de estrés hay un aumento de los niveles de ROS que puede llevar a daños severos de las proteínas, los lípidos y del DNA, incluso causando la muerte celular (Xiong et al., 2019). Afortunadamente, la planta tiene un sistema de defensa llamado sistema antioxidante, el cual está compuesto por enzimas (superóxido dismutasa SOD, peroxidasa POD, catalasa CAT, ascorbato peroxidasa APX) y compuestos no enzimáticos (glutación, ácido ascórbico y carotenoides) (Apel & Hirt, 2004). El sistema antioxidante tiene la capacidad de reducir el daño causado por las ROS y logra mantenerlas en equilibrio lo que permite la estabilidad general de las membranas celulares y de las proteínas, que son esenciales para el mecanismo de respuesta al estrés (Anjum et al., 2011).

El desbalance que se produce por el aumento de ROS en la célula impacta directamente al aparato fotosintético (Anjum et al., 2017). La clorofila es quizás el componente esencial del proceso de fotosíntesis y su concentración es un indicador de la tasa fotosintética (Marcińska et al., 2013). El contenido de fotopigmentos es susceptible a cambios ambientales y durante la exposición a déficit hídrico pueden verse expuestos a fotooxidación, llevando a la degradación y disminución en su concentración (Manivannan et al., 2007). La capacidad de mantener la concentración de fotopigmentos estable, e incluso aumentarla, durante la respuesta a déficit hídrico se ha descrito como una característica de tolerancia, protegiendo los cloroplastos y manteniendo la tasa fotosintética (Jia et al., 2015; Mohammadkhani & Heidari, 2007).

Nivel fisiológico

Las vías activadas durante la respuesta a estrés llevan a muchos cambios a nivel fisiológico; dentro de los más relevantes está el cierre de estomas (Lamers et al., 2020). Las plantas al sentir baja disponibilidad de agua presentan una reducción de la conductancia estomática, lo que a su vez significa la disminución de la transpiración que conlleva a disminución en la toma de CO₂ lo cual incide negativamente en la tasa fotosintética, impactando en los distintos componentes del fotosistema, así como en otros procesos como área de evaporación, así como en el crecimiento, lo que se observa en la Figura 1 (Harb et al., 2010).

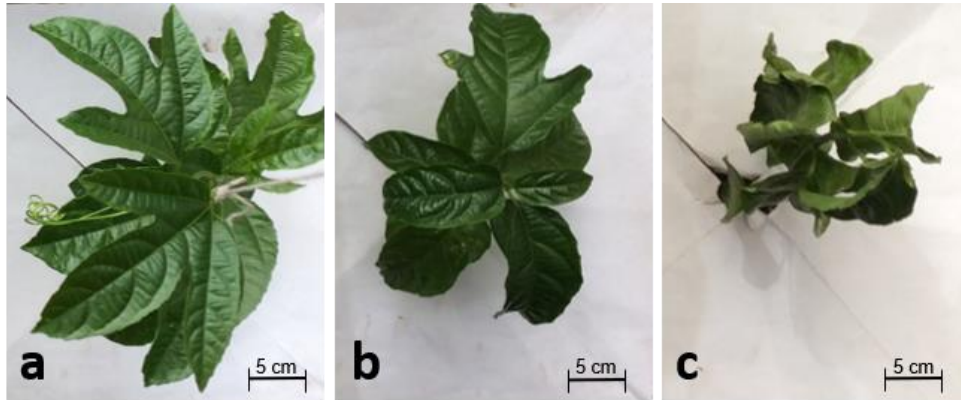


Figura 1. Plantas de gulupa bajos control (a), reducción del 50% del riego (b) y reducción total del riego (c) durante 40 días. Tomado de (Lozano-Montaña et al., 2021) .

La primera respuesta ante el déficit hídrico es el cierre de estomas, proceso que reduce la pérdida de agua por transpiración pero que lleva a la reducción de la toma de dióxido de carbono y de nutrientes del suelo, comprometiendo la fotosíntesis y el metabolismo de las plantas (Basu & Rabara, 2017). A su vez, las plantas bajo estrés presentan una reducción de parámetros fisiológicos como el contenido relativo de agua (CHR), el potencial hídrico de las hojas (ψ_{hf}), la tasa de transpiración y el aumento de temperatura de las hojas. Estos parámetros están estrechamente relacionados con la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas, así como con la actividad metabólica y el índice de tolerancia a la deshidratación (Anjum et al., 2011).

El cierre estomático es una respuesta tanto a la baja disponibilidad de agua en suelo como al bajo porcentaje de humedad en el aire con una alta demanda evaporativa (Pinheiro & Chaves, 2011), afectando el continuo suelo-planta-atmósfera y el proceso de enfriamiento de las hojas, por lo que se observa que la temperatura de la superficie foliar aumenta (Schulze, 2003). Sin embargo, la transpiración no es el único proceso que se ve directamente afectado por el cierre de estomas, también la respiración se ve comprometida y de esta manera la toma y fijación de CO_2 . Esto se va a ver reflejado en una reducción de la tasa fotosintética que a su vez desencadenará problemas generalizados en el metabolismo de la planta (Yordanov et al., 2000).

El estrés por déficit hídrico impacta a la fotosíntesis, afectando componentes importantes como la membrana tilacoidal, los complejos proteínicos entre ellos los fotosistemas y la tasa de transporte de electrones; así como el ciclo de Calvin y la absorción de dióxido de carbono (Anjum et al., 2011). A su vez, la clorofila es el componente principal de la fotosíntesis, y su

concentración en las hojas se correlaciona positivamente con la tasa de fotosíntesis, presentando una disminución en su concentración durante el estrés lo que se conoce como un síntoma de estrés oxidativo. La disminución en la concentración es el resultado de la fotooxidación y degradación del pigmento (Manivannan et al., 2007).

Según observaciones realizadas por Kautsky & Hirsch, (1931) es posible relacionar los cambios en la fluorescencia de la clorofila a con cambios en la asimilación de CO₂ y en la tasa de fotosíntesis. La toma de CO₂ se ve directamente impactada por la variación en la tasa de transpiración de las hojas por lo que en situaciones de estrés la fluorescencia puede verse influenciada (Baker, 2008).

Durante el proceso de toma de energía solar por parte de las moléculas de clorofila; la energía resultante se puede ir por tres caminos, un proceso fotoquímico y dos no-fotoquímicos, que compiten por la energía, por lo que las condiciones de estrés van a alterar la distribución de la energía (Maxwell & Johnson, 2000). En el primer camino conduce a la realización de la fotosíntesis y los otros dos caminos, o el exceso de energía, puede disiparse térmicamente o en forma de emisión de radiación infrarroja de baja energía conocida como fluorescencia de la clorofila (Emerson & Arnold, 1932). En lo que respecta a las condiciones de déficit hídrico se ha reportado ampliamente el uso de la fluorescencia de la clorofila a, ya que esta tiene una alta sensibilidad al sensar alteraciones sobre el fotosistema 2 (Mehta et al., 2010).

La fluorescencia de la clorofila a es bastante baja en condiciones normales, alrededor del 0,5% de la energía total absorbida; en comparación con la energía utilizada por los complejos antena del cloroplasto para la fotosíntesis que es casi del 97%, y la disipación calórica que es del 2,5%. Cuando no ocurre la absorción de fotones por parte de los fotopigmentos, la energía se disipa en su mayoría como calor (95-97%) y como fluorescencia (2,5-5%) (Maxwell & Johnson, 2000).

La cinética de la fluorescencia de la clorofila a se divide en dos partes. La primera se conoce como "Fase rápida" y ocurre dentro del primer segundo de iluminación, en donde se observa un incremento rápido de la fluorescencia con ciertos picos específicos conocidos como O-J-I-P y se relaciona con eventos primarios del Fotosistema 2 (PSII). La segunda parte de la curva de fluorescencia se conoce como "Fase lenta" donde se observa un declive en los valores durante varios minutos, esta fase está asociada con procesos metabólicos en el estroma del cloroplasto y con la asimilación de CO₂ (Moreno et al., 2008). La fase rápida de la curva que empieza en el punto O, que corresponde al valor con los centros de reacción abiertos previos a la exposición lumínica, el siguiente punto de la curva J se relaciona con la

reducción parcial de la QA, luego el punto I donde la QB también queda parcialmente reducida al recibir electrones, finalmente se llega al punto P donde las plastoquinonas se reducen y se obtiene el valor más alto de fluorescencia y todos los centros de reacción del PSII están cerrados o totalmente reducidos.

Con el seguimiento de la cinética de la fluorescencia se pueden realizar diferentes cálculos relacionados. Hay gran variedad de parámetros derivados de las mediciones básicas del fluorómetro. Dentro de estos parámetros se encuentra aquel que mide la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, que da un índice general de la fotosíntesis y de la fijación de carbono; a su vez desde este valor se puede calcular la tasa de transporte de electrones; también se encuentra el parámetro de Quenching fotoquímico, similar a la eficiencia fotoquímica del PSII pero mayormente relacionado con el número de centros fotosintéticos disponibles para la captura de energía (Maxwell & Johnson, 2000).

Por otro lado, se pueden determinar parámetros relacionados con los procesos no fotoquímicos. Con el cálculo del Quenching no fotoquímico se obtiene una relación directa con la disipación de energía a través del calor y a partir de esto se pueden realizar extrapolación de los resultados y determinar más parámetros. Con los valores de fluorescencia obtenida de hojas adaptadas a oscuridad se pueden obtener resultados con asunciones de eficiencia fotoquímica a su máximo potencial (Maxwell & Johnson, 2000).

Otra herramienta que se está implementando en el análisis de la respuesta a estrés en plantas es la reflectancia, la cual permite estimar la energía reflejada por un objeto específico (He et al., 2005), en este caso de las hojas de la planta. La huella espectral de la vegetación absorbe en las longitudes de onda rojas y azules y refleja en las verdes; además, refleja fuertemente en el infrarrojo cercano y absorbe fuertemente en las longitudes de onda donde el agua atmosférica está presente (Lobos & Hancock, 2015). A través de su comportamiento se puede determinar cambios a nivel fisiológico, ya que, dependiendo del contenido de agua, pigmentos, carbono, nitrógeno, así como otras propiedades influyen en distintos valores de la curva de reflectancia. Medir estas relaciones puede explicar el estado de la planta, su contenido hídrico, estreses ambientales, e índices de vegetación (VIs) (Meneses et al., 2015; Vila et al., 2011).

Cada cultivo tiene una firma espectral típica que está relacionada con la fisiología y las condiciones en las que se mantiene y está condicionada por la presencia de pigmentos, la estructura foliar y el contenido de humedad (Chuvieco-Saliner, 2010). La huella espectral de las plantas se caracteriza generalmente por tener un comportamiento muy cromático; en el espectro visible tiene valores bajos, con un máximo relativo cercano a los valores de

0,55 μm , que es lo que da el color verde a la vegetación. Las plantas sanas presentan un aumento en los valores de reflectancia en el infrarrojo cercano, que se relaciona con la presencia de pigmentos, estructura del mesófilo y contenido de agua. Todos los pigmentos absorben en 0,45 μm y hay una segunda banda de absorción a 0,64 μm (Chuvienco-Salinero, 2010); entre estas dos longitudes existe una banda donde la absorbancia es menor (mayor reflectancia), que corresponde con el verde y se debe a la clorofila.

En la zona correspondiente al infrarrojo cercano se observa un aumento en los valores de reflectancia, lo que se relaciona con la estructura interna celular de la hoja que dispersan la mayor parte de la energía. Si una hoja está sana se tendrán valores altos en esta parte y bajos en el espectro visible. A partir de 1,4 μm el efecto absorbente del agua se ve reflejado y vuelven a bajar los valores en el infrarrojo medio (Martínez-Barbáchano & Solís-Miranda, 2018). En plantas estresadas habrá comportamientos espectrales distintos a lo anteriormente descrito.

Los índices de vegetación (VIs) se han obtenido gracias al entendimiento de que las propiedades de reflectancia a una o más longitudes de onda revelan características específicas de la vegetación, y pueden ser clasificados en varias categorías de acuerdo con su robustez, base científica y aplicabilidad. Dentro de estas categorías están algunos que se relacionan en mayor medida con condiciones de estrés como el Broad band greenness (Verdor de banda ancha), el Light Use Efficiency (eficiencia del uso de la luz), el Leaf Pigment (Pigmentos foliares) y el Canopy water content (Contenido hídrico del dosel) (Gitelson et al., 2003; Huete et al., 1997).

La categoría Broad band greenness indica sobre el estado y vigor de la vegetación verde. Los distintos índices de esta categoría se obtienen con la comparación de las propiedades reflectivas en la zona del infrarrojo cercano del espectro y con las propiedades de absorbancia en el rojo, dando así una idea general de la concentración y calidad del material fotosintético (Datt, 1999). Dentro de esta categoría está el índice de diferencia normalizado de vegetación o NDVI, descrito por Lichtenthaler et al. (1996); este es quizás el índice más conocido y usado, al ser simple y efectivo en la cuantificación de vegetación, su rango de variación es de -1 a 1 y en plantas sanas suelen tener valores entre 0,20 y 0,80.

Por su parte, la categoría de Light Use Efficiency tiene índices que explican sobre la capacidad de la vegetación de usar la luz incidente en la fotosíntesis. La planta al tener un rango de absorción de energía para la fotosíntesis restringido entre 400 nm y 700 nm permite relacionarlo con su estado de crecimiento y producción de biomasa (Zhou et al., 2021). Dentro de estos índices se encuentran el PRI o Photochemical Reflectance Index,

descrito por Gamon et al., (1997), el cual utiliza los cambios de los carotenoides, principalmente de las xantofilas, durante el proceso de absorción de luz para predecir producción y estrés en la vegetación, tiene un rango de variación de -1 a 1 y las plantas sanas suelen tener valores de -0,2 a 0,2. También se tiene el Índice SIPI o Structure Insensitive Pigment Index, el cual explica sobre la cantidad de luz absorbida durante la fotosíntesis corregida por la dispersión de los fotopigmentos en el tejido vegetal (Peñuelas & Inoue, 1999).

La categoría Leaf Pigment cuenta con índices diseñados para medir los pigmentos relacionados con la respuesta al estrés en hojas como la clorofila, los carotenoides y las antocianinas. Varios de estos pigmentos suelen aumentar su concentración en plantas sometidas a estrés (Tucker, 1979). Uno de sus índices es el ARI o Anthocyanin reflectance index, usado para medir la concentración de antocianinas, tiene un rango de variación de 0 a 0,2 con valores entre 0,001 y 0,1 en plantas sanas (Gitelson et al., 2003).

La categoría relacionada con el estado hídrico o Canopy Water Content tiene índices que fueron diseñados para poder medir la cantidad de agua contenida en la vegetación, y tiene una relación directa con el estado de la planta. Dentro de estos índices está el WBI o Water Band Index que es sensible a cambios en el contenido hídrico y es comúnmente usado en estudios ecofisiológicos, tiene un rango de variación entre 0.8 y 1.2 (Peñuelas & Inoue, 1999).

Passiflora edulis Sims. f. edulis

La gulupa también conocida como maracuyá morado o fruta de la pasión, es una planta que pertenece a la familia Passifloraceae, que comprende alrededor de 630 especies agrupadas en 18 géneros. El género pasiflora de mayor importancia dentro de la familia, cuenta con 530 especies y la mayoría son nativas de la zona tropical de Suramérica, con el mayor número en Colombia (135 especies) (Perea Dallos et al., 2010; Sousa et al., 2015).

En esta familia se encuentran además otros frutales de importancia económica como son la granadilla (*Passiflora ligularis*), el maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), la curuba (*Passiflora mollissima*), la cholupa (*Passiflora maliformis*) y la badea (*Passiflora quadrangularis*). En general, estas plantas se caracterizan por ser enredaderas herbáceas con hojas alternas lobadas y con zarcillo axilares (Hernández, 2003).

La gulupa es una planta originaria de Suramérica, con un rango de crecimiento de 1600 a 2600 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas óptimas de 16 a 22 °C y humedad

relativa del 60 al 70%. Al igual que las demás especies del género comparte las características de planta enredadera, con un único tallo principal del cual se genera ramas auxiliares que dan origen a los botones florales. Tiene hojas alternas con hasta 5 lóbulos y zarcillos axilares, sus flores son hermafroditas axilares de color morado con un diámetro de 8 centímetros (Figura 2). El ciclo de cultivo inicia con la siembra, necesitando de 180 días para llegar hasta el punto de producción; este periodo tiene una duración de hasta 1 mes y teniendo un periodo de 2 meses entre cada cosecha que coinciden con los ciclos de lluvia. Bajo buenas prácticas de cultivo una misma planta puede tener una vida útil de hasta 4 años (Melgarejo et al, 2011).



Figura 2. Planta de gulupa (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) con flor y fruto.

El cultivo de gulupa actualmente está presente en 24 departamentos del Colombia, distribuido en 422 municipios. Los departamentos con mayor producción son Antioquia, Tolima y Cundinamarca, siendo Antioquia el líder en producción (Ministerio de Agricultura, 2020). Para 2019 las exportaciones en fresco de gulupa alcanzaron las 8.725 toneladas produciendo más de 30 millones de dólares, siendo la tercera especie en fresco más exportada del país, luego del aguacate y de la uchuva; su principal destino es Holanda, seguido de Bélgica y Reino Unido, y desde el 2019 se abrió las puertas a nuevos mercados como Qatar (ASOHOFrucol, 2020).

Este cultivo ha adquirido gran importancia desde inicio de siglo, alcanzando un total de 2.144 hectáreas para 2020, y posicionándose entre los 10 países con mayor producción y exportación de gulupa, aportando un total de 2,9% al mercado global. En palabras del presidente de ASOHOFrucol, esta fruta tiene un gran potencial exportador principalmente a mercados europeos, por el Grado Brix (cantidad de azúcar) que concentra y su tamaño de fácil consumo, acompañado de un aroma y color llamativo (ASOHOFrucol, 2020).

Para la gulupa se ha reportado la necesidad de un riego bien distribuido durante su ciclo de crecimiento (Ocampo Pérez & Wyckhuys, 2012), debido a que la presencia de déficit hídrico durante la germinación y la floración puede llevar a frutas pequeñas o al aborto de estas (Jiménez et al., 2011). La falta de agua es uno de los factores ambientales responsables por la baja en producción de este cultivo, llevando a la fuerte reducción de hojas, flores y frutos (Rodrigues et al., 2017).

También se ha reportado que estas plantas presentan tolerancia frente a las condiciones de déficit hídrico, lo que se debe a la respuesta estomática y cambios en la tasa fotosintética, logrando mantenerse bajo condiciones de estrés por varios días teniendo reducción en el crecimiento aéreo y logrando recuperar sus propiedades hídricas tras la reactivación del riego (Carr, 2013; García-Castro et al., 2017; Lozano-Montaña et al., 2021).

Estudios moleculares en Gulupa

En gulupa los estudios de carácter molecular son recientes, algunos en diversidad genética (Castillo et al., 2021) otros enfocados en el transcriptoma (Gao et al., 2016). Actualmente no existe un transcriptoma de gulupa disponible en las bases de datos pese a que ya se han publicado varios artículos relacionados con el tema; entre estos está un estudio comparativo de dos variedades de este cultivo frente al estrés por frío (Y. Wu et al., 2020) y un estudio de identificación de genes de respuesta a frío en una variedad resistente y otra susceptible (Liu et al., 2017) en donde se aclara que la información sobre la regulación génica y vías de señalización en gulupa es escasa.

Qiu et al., (2020) realizaron un estudio combinando de análisis transcriptómico y metabolómico de los mecanismos de coloración diferencial entre gulupa y maracuyá. Por su parte Xu et al., (2019) publicaron sobre los mecanismos transcripcionales adaptativos de gulupa en zonas bajas de nutrientes encontrando una serie de genes diferencialmente expresados asociados a la toma de nutrientes.

Ma et al., (2021) realizaron el ensamblaje del genoma a nivel de cromosoma de la fruta de la pasión, sin distinguir entre maracuyá o gulupa, relacionado con un análisis transcriptómico de genes de la biosíntesis de aroma. Por otra parte, Xia et al., (2021) publicaron el ensamblaje del genoma de gulupa en búsqueda de genes involucrados en la evolución y síntesis del sabor. Wu et al., (2020) publicaron un estudio sobre la identificación y cuantificación de genes relacionados con la infección radicular de *Phytophthora infestans*.

En general los estudios encontrados se centran en el estudio de rutas metabólicas no relacionadas con la respuesta a estrés hídrico. Lozano-Montaña et al., (2021) reportan uno de los primeros acercamientos al estudio de la respuesta a nivel molecular de gulupa frente al estrés por déficit hídrico, donde se estudia los cambios en la expresión relativa de 4 genes anteriormente reportados para este estrés en otras plantas.

Transcriptómica

Todos los procesos descritos anteriormente están mediados por la información génica de cada especie y a su vez de los cambios en el transcriptoma durante la respuesta al estrés (Mashaki et al., 2018). El transcriptoma es la colección y cuantificación completa de los transcritos de una célula, se obtiene bajo una condición fisiológica concreta y un estado de desarrollo específico. Está relacionado con el entendimiento de los elementos funcionales del genoma, teniendo en cuenta todos los tipos de transcritos: RNAm, RNA no codificantes y RNA pequeños, la estructura transcripcional de las secuencias (sitios de inicio y cierre, patrones de splicing y otras modificaciones transcripcionales), y los cambios en los niveles de expresión bajo distintas condiciones (Wang et al., 2009).

Actualmente existen distintas técnicas para el estudio del transcriptoma en distintos organismos, entre las que se encuentra los métodos de microarreglos y más recientemente la técnica conocida como RNA-seq dirigida generalmente a organismos eucariotas. Esta última técnica utiliza las tecnologías de secuenciación recientes en moléculas de DNAC, este DNAC se obtiene desde el RNA extraído de los tejidos de interés y su posterior retrotranscripción. Dependiendo de la información disponible del organismo en cuestión se procede a realizar un alineamiento de las secuencias a un genoma de referencia o a realizar un ensamblaje *de novo* (Wang et al., 2009)

Los estudios por RNA-seq han sido posibles debido a los avances en la tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos de los últimos años, estas tecnologías son conocidas como métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) y han sido los responsables de revolucionar la biología molecular (M. Wang et al., 2011). La NGS consiste en varios pasos, el primero es la preparación de las librerías, donde se obtienen fragmentos cortos de DNA. El segundo paso consiste en el enriquecimiento y captura de DNA, aquí los fragmentos obtenidos en el paso anterior se unen a adaptadores que permiten la separación y fijación para pasar al tercer paso, la secuenciación que consiste en la polimerización de la cadena de DNA combinado con la detección de los ácidos nucleicos (Mutz et al., 2013).

La selección de la plataforma de secuenciación a usar depende de varios factores, dentro de los que se encuentra el costo, tiempo y facilidad de acceso; dentro de las más usadas

están las desarrolladas por la compañía Illumina, Hiseq 200 y 250 (Barba et al., 2014). A su vez, esta técnica cuenta con varias ventajas sobre otras técnicas utilizadas en estudios de transcriptómica, como es el no tener que contar con un genoma de referencia para su uso lo que lo hace sumamente atractivo para organismos no modelos, así como tiene una mayor precisión en la determinación de cambios en los niveles de expresión y poder emplearse con poca cantidad de muestra de RNA (Zhang et al., 2019).

En el caso de estudios de expresión génica diferencial (DGE), cuyo objetivo principal es el de identificar las diferencias en los niveles de transcripción entre dos o más condiciones o tratamientos, se hace necesario la obtención de varianza a través de replicas biológicas y técnicas, así como establecer una profundidad de secuenciación con el fin de entender los cambios durante un proceso de respuesta e identificar los elementos del genoma involucrados (Chen, 2020).

Para realizar el análisis de los datos de RNA-seq se debe comenzar con determinar la calidad de las lecturas o de los fragmentos secuenciados, a través de la cuantificación del contenido CG, que debe estar alrededor del 30% y ser consistente entre las muestras. También se debe rectificar la presencia de adaptadores, lecturas duplicadas u otras fuentes de contaminación (Conesa et al., 2016). La evaluación de la calidad se puede realizar con el programa FastQC, el más utilizado para las secuencias obtenidas a través de Illumina (Wingett & Andrews, 2018), y para eliminar bases y lecturas que presentan baja calidad se puede utilizar los programas como FASTX-Toolkit, SeqTK o Trimmomatic (Bolger et al., 2014).

Tras obtener lecturas con buena calidad sigue la alineación con un genoma o transcriptoma de referencia si se cuenta con alguno, esto se puede realizar con distintas herramientas como Bowtie o BWA (Langmead & Salzberg, 2012; H. Li & Durbin, 2009; I. S. Yang & Kim, 2015). Si no se cuenta con un genoma o transcriptoma de referencia se debe proceder con un ensamblaje de novo, con ayuda de plataformas como Trinity, Velvet-Oases o SOAPdenovo-Trans (Kukurba & Montgomery, 2015).

Finalmente, tras obtener el mapeo de las lecturas a los genes del organismo en cuestión, se pasa al objetivo principal de la mayoría de los estudios, la cuantificación y análisis de la expresión diferencial de genes (Yang & Kim, 2015). En este paso se mide el número de lecturas asociadas a un gen a partir de los datos de RNA-seq, con algoritmos como RSEM. Los datos obtenidos se expresan en FPKM (Fragment per kilobase per million) o como TPM (transcripts per million) (Li & Dewey, 2011). Al tener las tablas de conteo construidas, en las filas los genes mapeados y en las columnas las muestras estudiadas, se utiliza comúnmente el software estadístico R y diferentes librerías como LIMMA, Deseq2 o edgeR de la

plataforma Bioconductor (Anders & Huber, 2010; Love, 2021; Robinson et al., 2010) . Entendiendo la diferencia de expresión como la relación entre el conteo del control y la muestra a analizar, lo que se conoce como Fold Change (FC) y al ser normalizado como Log Fold Change (LFC) (Conesa et al., 2016).

Objetivos

General:

Caracterizar la expresión diferencial del transcriptoma de gulupa durante la respuesta temprana a estrés por déficit hídrico asociado a cambios fenotípicos a nivel fisiológico

Específicos:

1. Describir los cambios en la conductancia estomática y en la fluorescencia de la clorofila en plantas de gulupa durante etapas tempranas de la respuesta a estrés por déficit hídrico.
2. Caracterizar los cambios observados en el contenido de clorofila y carotenoides durante etapas tempranas de la respuesta a estrés por déficit hídrico.
3. Identificar los genes expresados diferencialmente en plantas de gulupa durante la respuesta temprana a estrés por déficit hídrico.

Capítulo 1

Análisis fisiológico de plantas de gulupa durante el proceso de respuesta a estrés por déficit hídrico

Abstract

Water deficit is one of the most persistent threats to food security, directly affecting the growth of different plant species and generating considerable losses. Therefore, constant research is required to decipher the resistance mechanisms of economically important species, as well as those that represent biodiversity. The gulupa is a crop of growing importance in Colombia, positioning itself among the fruits with the highest annual export, this crop, when subjected to changes in irrigation conditions, shows a reduction in growth and production. Based on previous studies, we conducted an analysis of the effect of water deficit on the physiology of gulupa plants in vegetative stage. For this purpose, we measured stomatal conductance (gs), leaf temperature (TF), photopigment content, chlorophyll fluorescence and leaf reflectance. From this, we describe the possible mechanisms, from a physiological aspect, used by this species in function of water scarcity, finding a response mainly associated to the described for avoidance but also presenting tolerance traits, where in search of maintaining water conditions, processes such as growth are sacrificed.

Key words: water stress; stomatal conductance; tolerance; avoidance; photopigments.

Resumen

El déficit hídrico es una de las amenazas más persistentes de la seguridad alimentaria, afecta directamente el crecimiento de distintas especies vegetales generando pérdidas considerables. Es por esto por lo que se requiere investigación constante en búsqueda de descifrar los mecanismos de resistencia de especies de importancia económica, así como de aquellas que representan a la biodiversidad. La gulupa es un cultivo de creciente importancia en Colombia, posicionándose dentro de las frutas con mayor exportación anual, este cultivo al verse sometido a cambios en las condiciones de riego presenta reducción de crecimiento y de producción. Basándonos en estudios anteriores realizamos un análisis del efecto del déficit hídrico sobre la fisiología de plantas de gulupa en estado vegetativo, para esto se realizaron medidas de conductancia estomática (gs), temperatura foliar (TF), contenido de fotopigmentos, fluorescencia de la clorofila y reflectancia foliar. A partir de esto se describen los posibles mecanismos, desde un aspecto fisiológico,

empleados por esta especie en función de la escasez de agua, encontrando así una respuesta asociada principalmente a lo descrito como evitación pero que también presenta rasgos de tolerancia, en donde en búsqueda de mantener las condiciones hídricas se sacrifican procesos como el crecimiento.

Palabras clave: estrés hídrico; conductancia estomática; tolerancia; evitación; ftopigmentos.

Introducción

El efecto del calentamiento global en la disponibilidad de agua a nivel mundial es una preocupación constante (Urrutia & Vuille, 2009), siendo la sequía una de las mayores amenazas enfrentadas por las plantas, afectando el proceso de desarrollo y crecimiento, y generando a la larga disminución en la productividad de especies de importancia agrícola (Lozano-Povis et al., 2021).

Distintos procesos fisiológicos y bioquímicos están involucrados en los mecanismos de respuesta que las plantas poseen para hacerle frente a condiciones ambientales adversas (Yang et al., 2021). La resistencia al déficit hídrico es el resultado de un proceso evolutivo que en ecosistemas naturales se asegura para conseguir el éxito reproductivo, y en agroecosistemas para alcanzar una producción alta, por lo que las estrategias entre las especies que pertenecen a cada ecosistema difieren (Bodner et al., 2015).

Una de las primeras respuestas en observarse y medirse es el cierre estomático, proceso que conlleva a la disminución en la transpiración y que es utilizado como señal de que la planta está sintiendo los cambios ambientales (Farooq et al., 2009). Otro de los procesos asociados a la respuesta a déficit hídrico es el cambio en los parámetros asociados a la fluorescencia de la clorofila, este nos muestra sobre el estado del fotosistema II, y se puede asociar al estado del contenido de fotopigmentos (Mehta et al., 2010). Y, en años más recientes se han establecido estudios de la firma espectral de cada especie y sus variaciones en relación con el ambiente (Chuvienco-Salineró, 2010).

Actualmente en Colombia un cultivo promisorio es la gulupa (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) (ASOHOFrucol, 2020), esta planta tiene la necesidad de un riego bien repartido durante las distintas fases de su ciclo de crecimiento (Ocampo Pérez & Wyckhuys, 2012), puesto que cambios en el régimen de riego puede llevar a disminución en la productividad (Jiménez et al., 2011). Se ha reportado que la gulupa, hablando sin distinción de variedades, reacciona a condiciones de déficit hídrico a través de una serie de cambios que conllevan a mantener el estatus hídrico de la planta y el uso eficiente del agua (Carr, 2013; García-Castro et al., 2017; Lozano-Montaña et al., 2021).

Se cree que la principal estrategia de respuesta expuesta por gulupa es la tolerancia (Lozano-Montaña et al., 2021), la cual se enfoca en una alta Eficiencia en el uso de agua o WUE, que según Passioura, 2002, junto con la toma de agua (WU – Water uptake) y el índice de cosecha (HI – Harvest index) son los que definen la producción. Hurtado-Salazar, Silva, et al., (2020) realizaron un estudio de la respuesta de 11 accesiones de 4 especies distintas

de *Passiflora* a estrés por déficit hídrico y salino, encontrando distintos rangos de tolerancia y clasificando a *P. edulis* Sims f. *edulis* como medianamente tolerante; indicando que aquellas especies muestran una pronta regulación de cierre estomático, ajuste osmótico y regulación de la expresión relacionada con la hormona ABA tiene potencial.

Pese a que hay distintos términos para describir el mecanismo o forma de respuesta de las plantas al déficit hídrico. En este capítulo se utiliza el término tolerancia para nombrar la estrategia de resistencia que se enfoca en cambios a nivel fisiológico y bioquímico que permiten mantener la tasa de crecimiento; y por otro lado la evasión para nombrar la estrategia que se caracteriza por el cierre estomático en búsqueda de mantener las relaciones hídricas de la planta, comprometiendo la tasa de crecimiento (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam, 2016).

El objetivo de este capítulo fue evaluar los cambios en la conductancia estomática, la temperatura foliar, la fluorescencia de la clorofila a, la reflectancia a través de su huella espectral y el contenido de clorofila, de plantas de gulupa sometidas a tratamiento de déficit hídrico progresivo, y describir de esta manera algunos mecanismos de respuesta de la planta.

Metodología

Material vegetal y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo durante los meses de agosto - septiembre del año 2021, donde se ubicaron plantas de gulupa de aproximadamente 3 meses de germinadas, con 5 hojas extendidas y sin zarcillos en los invernaderos ubicados en el Departamento de Biología, de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia. Dentro del invernadero se manejaron condiciones climáticas controladas de humedad y temperatura, manteniendo la humedad en un rango de 45 a 80%, con una media de 65% y la temperatura entre 14 y 32°C con una media de 18°C, durante la duración del experimento. Se utilizó una mezcla de suelo orgánica que consistió en una proporción 3:2:1 de tierra, arena y gallinaza, respectivamente. Las plantas se mantuvieron en óptimas condiciones de agua y nutrición.

Los individuos fueron sometidos a un diseño experimental completamente aleatorio con cuatro puntos de muestreo en el tiempo, 0, 5, 10 y 15 días después de iniciado el tratamiento (ddt). Los individuos se dividieron en dos tratamientos, Control con riego a capacidad de campo (C), y Tratamiento de déficit hídrico de restricción completa del riego (E).

Mediciones de variables fisiológicas

La conductancia estomática (gs) y la temperatura foliar (TF) fueron medidas en las horas de la mañana (9:00 h) en cada uno de los puntos de muestreo (día 0, 5, 10 y 15). Se tomaron cinco individuos de manera aleatoria para cada tratamiento y se tomó una hoja del tercio medio de la planta para realizar la medición en la zona media de la hoja. Se usó el porómetro portátil (SC-1, Steady State Diffusion Porometer, Decagon Services, USA) (Perez Martinez & Melgarejo, 2015).

Se obtuvieron las medidas relacionadas con la fluorescencia de la clorofila a usando el fluorómetro no modulado (Pocket PEA, Hansatech Instruments UK) y, al igual que con gs, se tomaron 5 individuos por tratamiento y la hoja del tercio medio de cada planta. La medición se realizó tras la puesta del sol (19:00 h), y previo a esto se realizó un proceso de adaptación a la oscuridad de 20 minutos con clips de hojas (Hansatech). Se utilizó el software PeaPlus para la lectura de los datos y análisis inicial de las variables asociadas a la cinética de la fluorescencia (Banks, 2017; Hansatech, 2006)

El Contenido relativo de clorofila (CC) se estimó con ayuda del clorofilómetro portátil (SPAD-502; Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan), utilizando una hoja del tercio medio de 5 individuos por cada tratamiento en cada uno de los puntos de muestreo. Estos datos se interpolaron a la curva de calibración de la especie (Lozano-Montaña et al., 2021).

Las mediciones de reflectancia se realizaron con el espectro radiómetro (Espectra evolution 1900) de rango completo PSR 3500 aplicando luz artificial en el rango de 350 a 2500 nm, durante horas de la tarde, tomando una hoja por individuo, 5 individuos por tratamiento para el último día de muestreo (15 ddt).

Contenido de Clorofilas y carotenoides

Para la determinación del contenido de fotopigmentos en hojas, se tomaron hojas del tercio medio de 3 individuos para cada tratamiento, en cada uno de los primeros tres puntos de muestreo. Las muestras fueron conservadas en -80°C , protegidas de la luz. Posteriormente se realizó el proceso de macerado con nitrógeno líquido y se tomó aproximadamente 50 mg de material por cada muestra, la cual fue utilizada para la realización del protocolo Arcoíris introducido por López-Hidalgo et al., (2021) en donde se obtuvieron valores de absorbancia para 664, 649 y 470 nm que se utilizaron para tener los datos de concentración de Clorofila a, b, carotenoides y clorofilas totales según las ecuaciones propuestas por (Lichtenthaler, 1987).

Análisis estadístico

A los datos obtenidos de las variables fisiológicas y bioquímicas se les sometieron a un análisis normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad para definir si se debía seguir el camino paramétrico o no paramétrico. Una vez realizado esto se decide realizar un ANOVA o la prueba de Kruskal Wallis para identificar diferencias para cada variable, seguido de comparaciones múltiples con la prueba de Tukey o Wilcoxon para obtener las diferencias entre los tratamientos entre cada punto y cada variable. Los análisis se realizaron con el software Rstudio (version 4.2.1, 2022).

Los datos de fluorescencia de la clorofila se analizaron con ayuda del software PeaPlus (Hansatech, England), en donde se realizó la curva OJIP para cada uno de los puntos de muestreo y tratamientos según lo descrito por Moreno et al., (2008). De las variables relacionadas con la fluorescencia de la clorofila, se analizaron un total de 52 con un análisis de componentes principales.

Por su parte, los datos de reflectancia se utilizaron para la obtención de índices, descritos en la tabla 1, para cada uno de los individuos de cada tratamiento en el último punto de muestreo (15 ddt). Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para comprobar diferencias entre los tratamientos.

Tabla 1. índices de vegetación (Vis)

Índice	Fórmula	Fuente
Índice de vegetación de la diferencia normalizada	$NDVI = (R800 - R680)/(R800 + R680)$	(Lichtenthaler et al., 1996)
Índice fotoquímico de reflectancia espectral	$PRI = (R531 - R570)/(R570 + R531)$	(Gamon et al., 1997; Peñuelas & Inoue, 1999)
Índice de pigmento independiente estructural	$SIPI = (R800 - R445)/(R800 + R680)$	(Penuelas et al., 2010)
Índice de reflectancia de antocianinas	$ARI = (1/R550) - (1/R700)$	(Gitelson et al., 2003)
Índice hídrico	$WBI = R900/R970$	(Penuelas et al., 2010)

Resultados

Las variables fisiológicas se analizaron por separado. Para cada conjunto de datos se realizaron las distintas pruebas de normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad, donde se encontró que para todas se contaba con aleatoriedad y homocedasticidad, pero no con normalidad, por lo que se prosiguió con un análisis estadístico no paramétrico, como se precisó en la metodología.

Conductancia estomática

La primera variable evaluada fue la conductancia estomática (gs). Como se observa en la Fig. 3 hay una tendencia de disminución en la conductancia para los individuos del Tratamiento con déficit hídrico, desde el ddt 5. Desde este día se encuentran diferencias entre los tratamientos, según la prueba de Wilcoxon de comparaciones múltiples, con un $p < 0,05$, lo que se mantiene para el ddt 10 en donde también se observan diferencias significativas entre los tratamientos y se incrementa para el 15 ddt. Para el ddt 0 los datos variaron en un rango de 187 a 132 $\text{mmoles de } \frac{\text{CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$, para el ddt 5 el rango los valores se alejan teniendo un rango de variación entre 66 y 173 $\text{mmoles de } \frac{\text{CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$, para el ddt 10 y 15 gs varía en un rango de 51 – 232 $\text{mmoles de } \frac{\text{CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ y 20 – 176 $\text{mmoles de } \frac{\text{CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$, respectivamente. Los datos no tienen una distribución normal, cuentan con homocedasticidad y aleatoriedad.

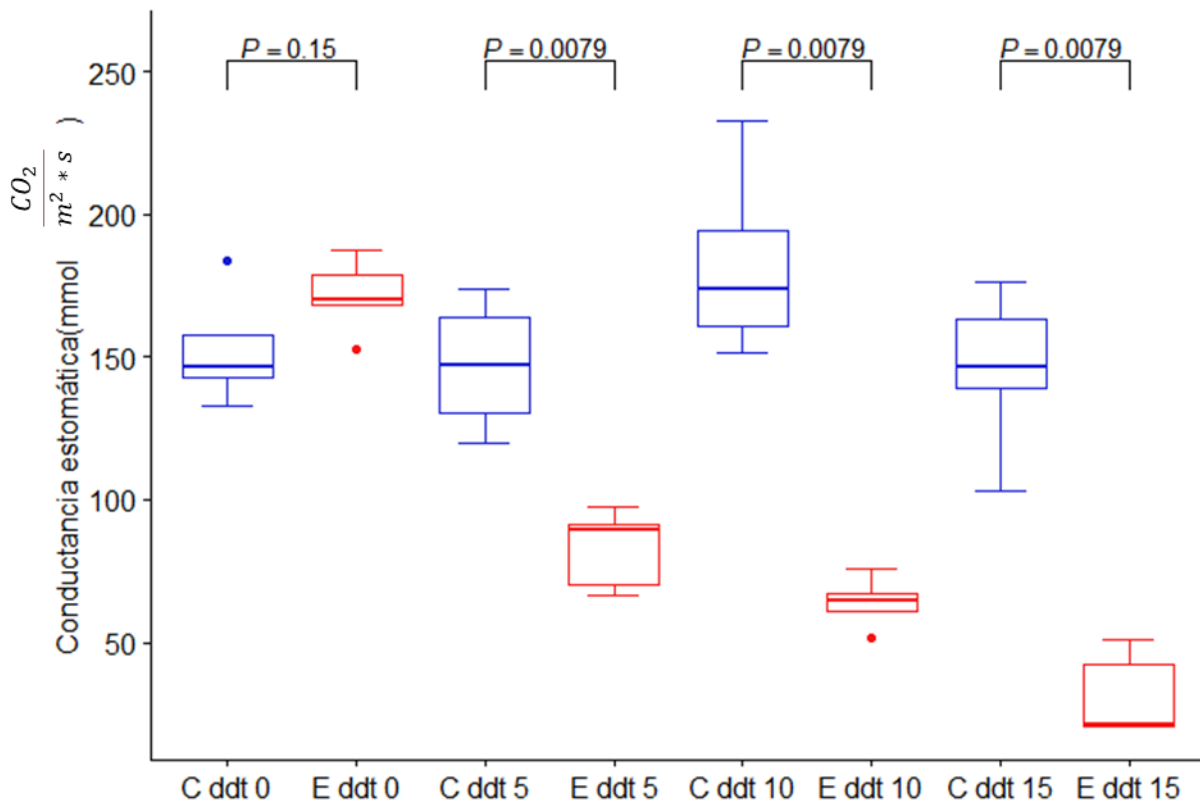


Figura 3. Cambios en la conductancia estomática (gs) en $\text{mmoles de } \frac{\text{CO}_2}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.

Temperatura foliar

La segunda variable que se evaluó fue la temperatura de la hoja (TF), la cual sigue un comportamiento opuesto a la conductancia estomática (gs). En la figura 4 observamos una tendencia de aumento de temperatura con diferencias significativas entre los tratamientos desde el ddt 5 de muestreo con un $p < 0,05$ según la prueba de Wilcoxon de comparaciones múltiples. Para el ddt 10 se observa un aumento en la TF de los individuos del Control; sin embargo, se mantienen diferencias significativas con respecto al Tratamiento por déficit hídrico. Para el ddt 0 la TF varió dentro de un rango de 20 a 23 °C, en el ddt 5 con el aumento de la Tf en el tratamiento el rango estuvo entre 21 y 24 °C; por su parte para el ddt 10 y 15

el rango estuvo entre 22-26 °C y 21 - 26°C , respectivamente. Los datos no tienen una distribución normal, cuentan con homocedasticidad y aleatoriedad.

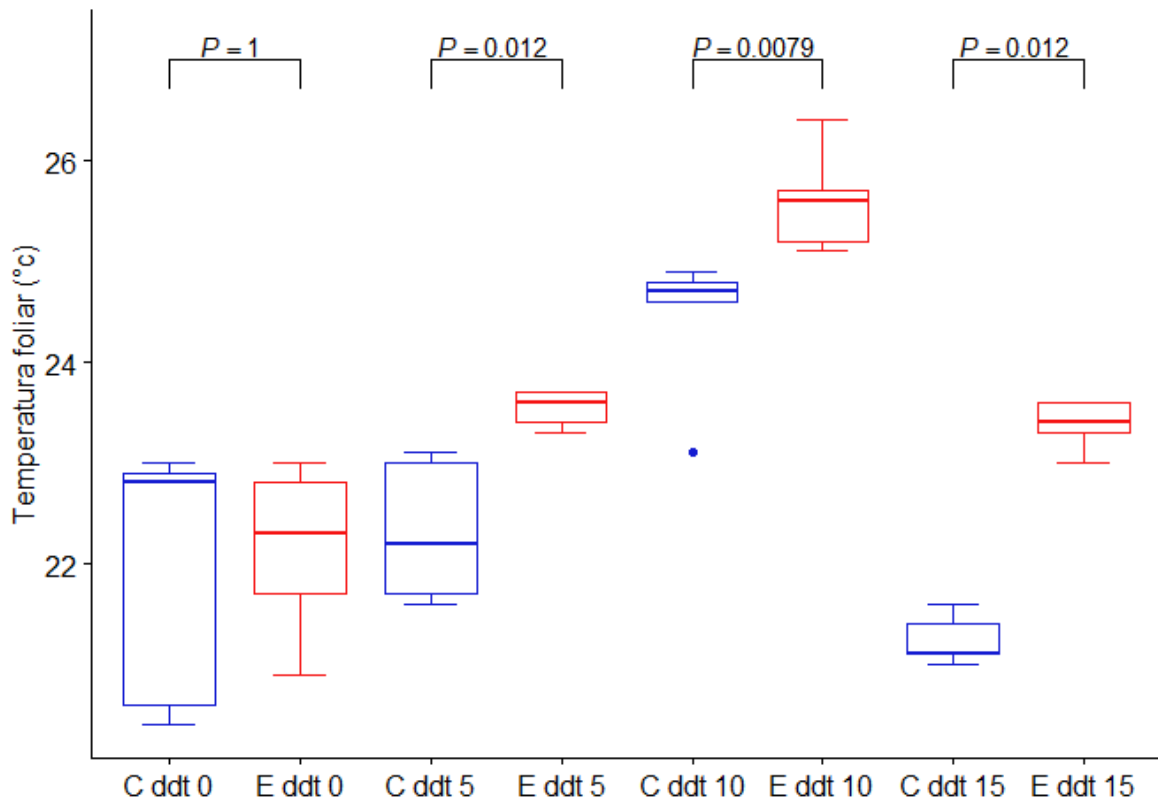


Figura 4. Cambios en la temperatura foliar (TF) a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.

Foto pigmentos

El contenido relativo de clorofila (CC) por su parte se mantuvo dentro de un rango similar entre los puntos de muestreo y no mostró diferencia significativa entre los tratamientos para ninguno de los días de muestreo (Fig 5). Los datos de CC se expresan en miligramo de clorofila por gramo de peso fresco ($mg \frac{chl}{g pf}$) y tuvieron un rango de variación similar para todos los puntos de muestreo, manteniéndose dentro de valores de $1,4 - 2,1 mg \frac{chl}{g pf}$. Los datos no tienen una distribución normal, cuentan con homocedasticidad y aleatoriedad.

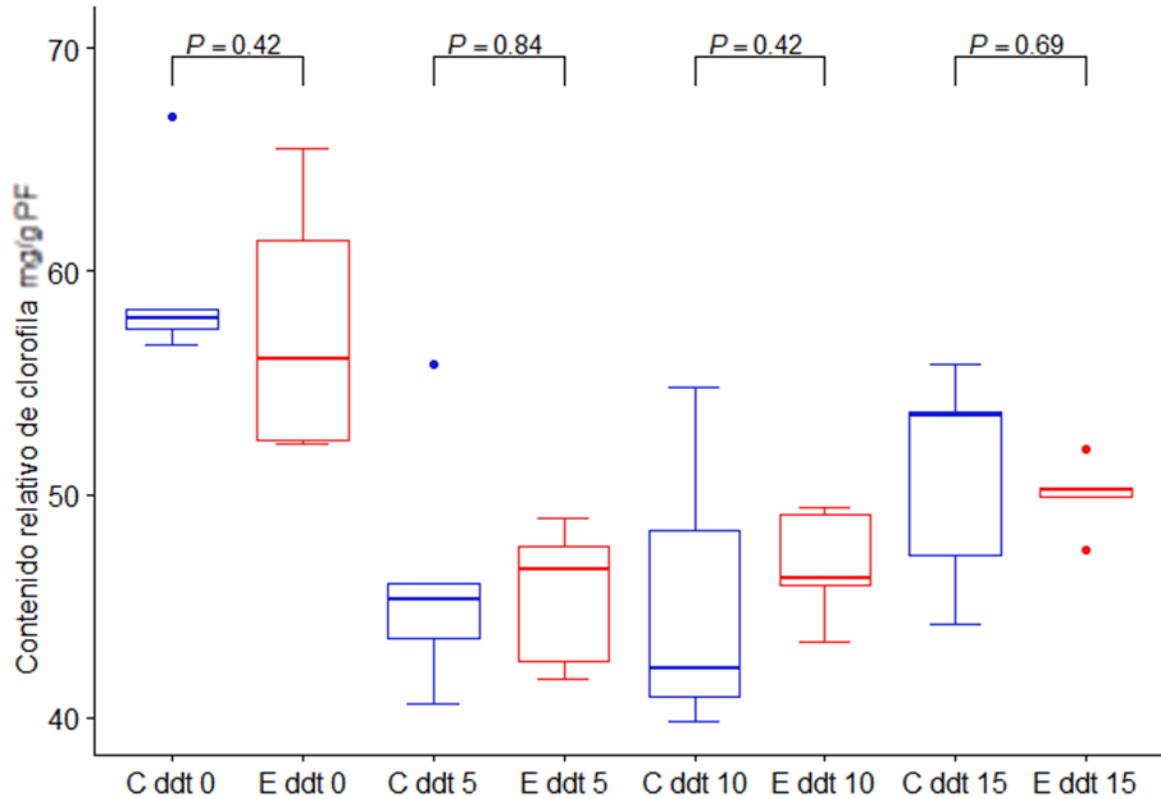


Figura 5. Cambios en el Contenido relativo de clorofila (CC) a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.

Por otra parte, a través de protocolos de extracción se obtuvieron valores de concentración de fotopigmentos en hojas. Al analizar los valores de concentración de clorofila a se encontró que a lo largo de los puntos de muestreo no hay diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto (Figura 6), los valores de clorofila a para las distintas muestras variaron en un rango de 0,38 a 0,63 $mg \frac{Chl}{g pf}$, estos datos siguen una distribución normal, con homocedasticidad y aleatoriedad.

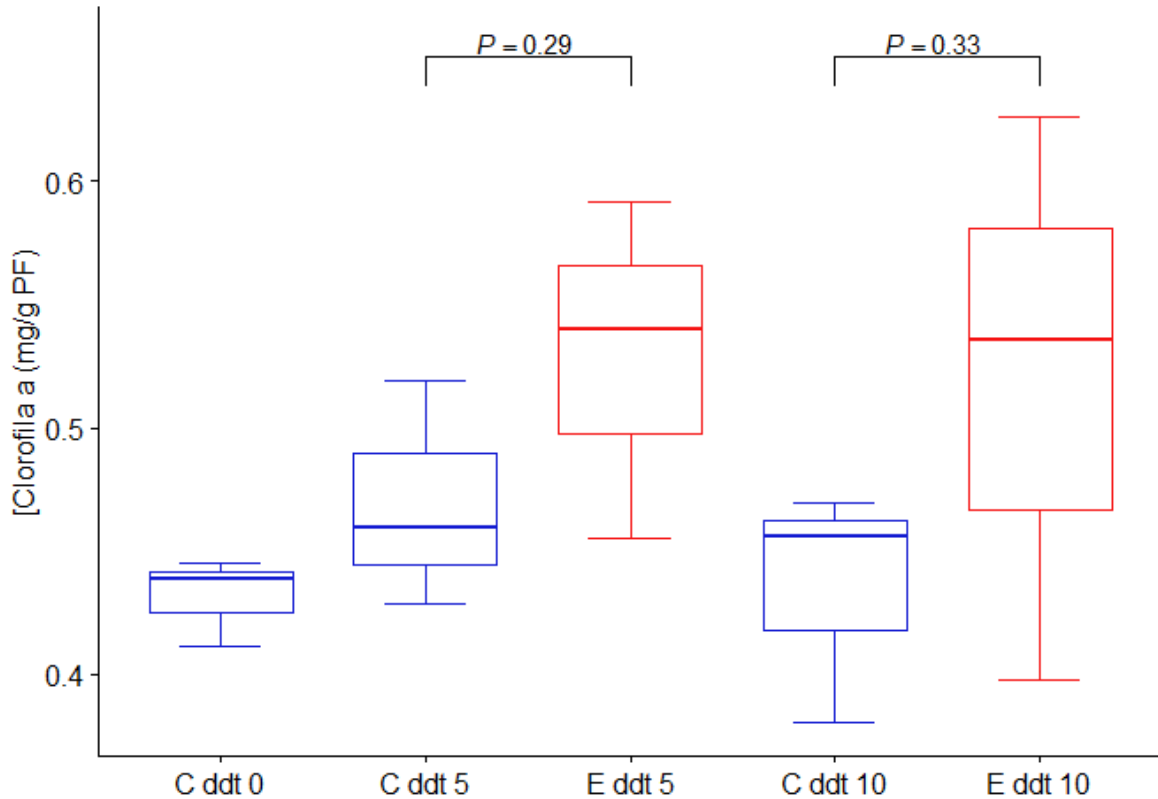


Figura 6. Cambios en el contenido de Clorofila a (mg/g PF), a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.

La clorofila b, según se puede ver en la figura 7, pese a no mostrar diferencias significativas entre los tratamientos, para el ddt 5 y ddt 10 si muestra una tendencia a valores más altos para el tratamiento de estrés. Los valores de clorofila b variaron en el rango de 0,67 a 1, $mg \frac{chl}{g pf}$, estos datos siguen una distribución normal, con homocedasticidad y aleatoriedad.

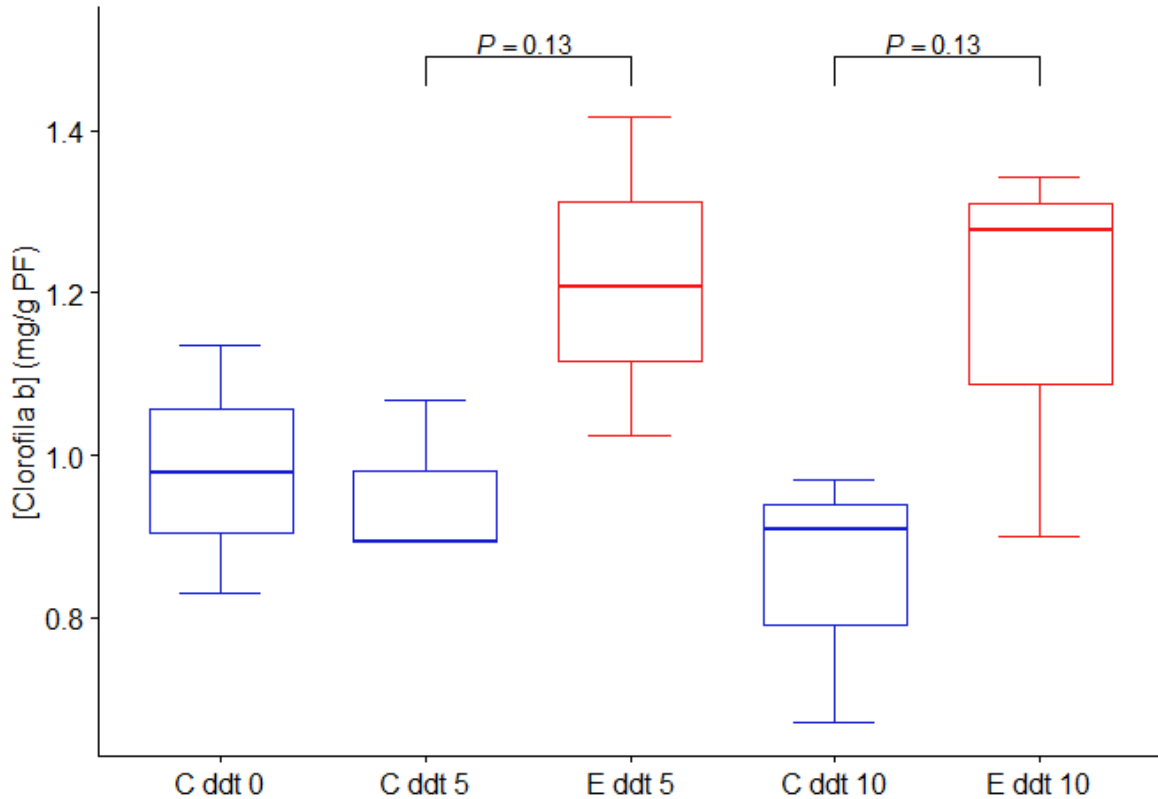


Figura 7. Cambios en el contenido de Clorofila b (mg/g PF), a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.

La concentración de clorofilas totales (Fig. 8), no mostró tendencia al aumento para el tratamiento con estrés ni mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Los valores observados variaron en un rango de 0,9 a $2,7 \text{ mg } \frac{\text{Chl}}{\text{g pf}}$, siguiendo una distribución normal, con homocedasticidad y aleatoriedad.

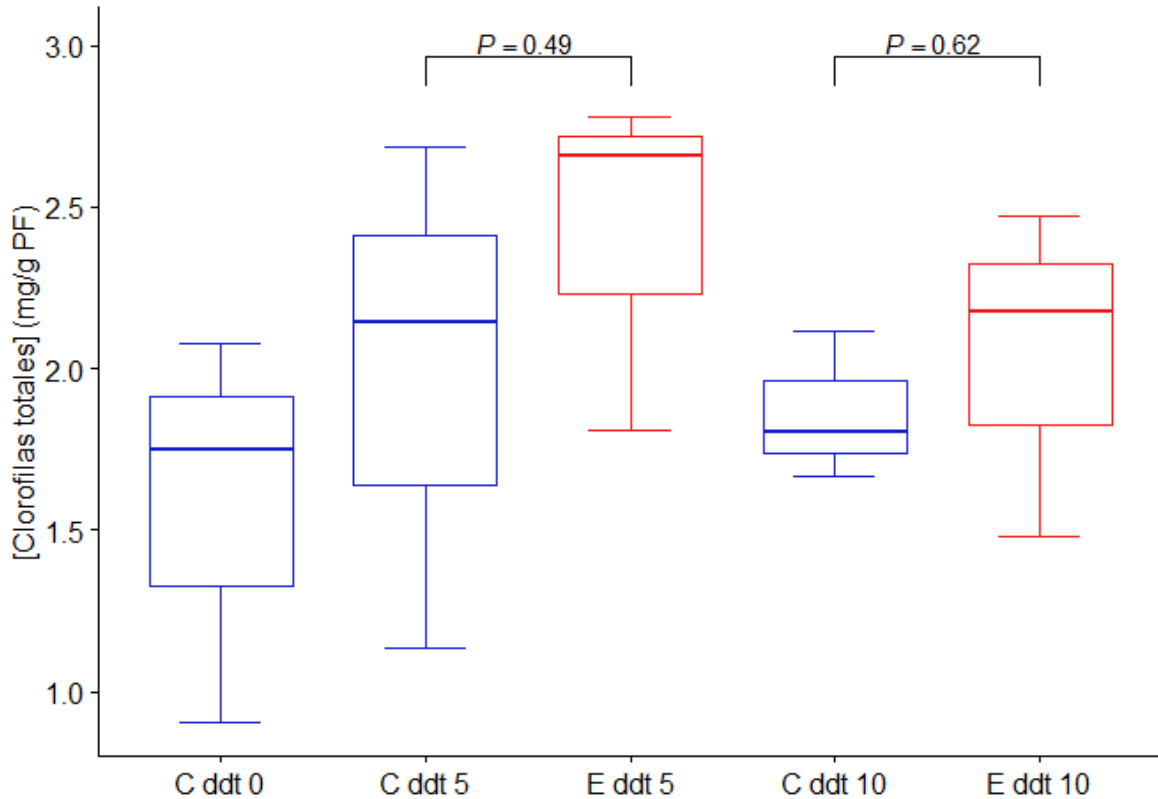


Figura 8. Cambios en el contenido de Clorofilas totales (mg/g PF), a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.

Los carotenoides (Fig. 9) tampoco mostraron diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo; sin embargo, para el ddt 10, hay una tendencia para el tratamiento de estrés a ser mayor al control, los datos de concentración de carotenoides variaron dentro de un rango de 0,22 a 0,78 $\frac{mg}{g\ pf}$, siguiendo una distribución normal, con homocedasticidad y aleatoriedad.

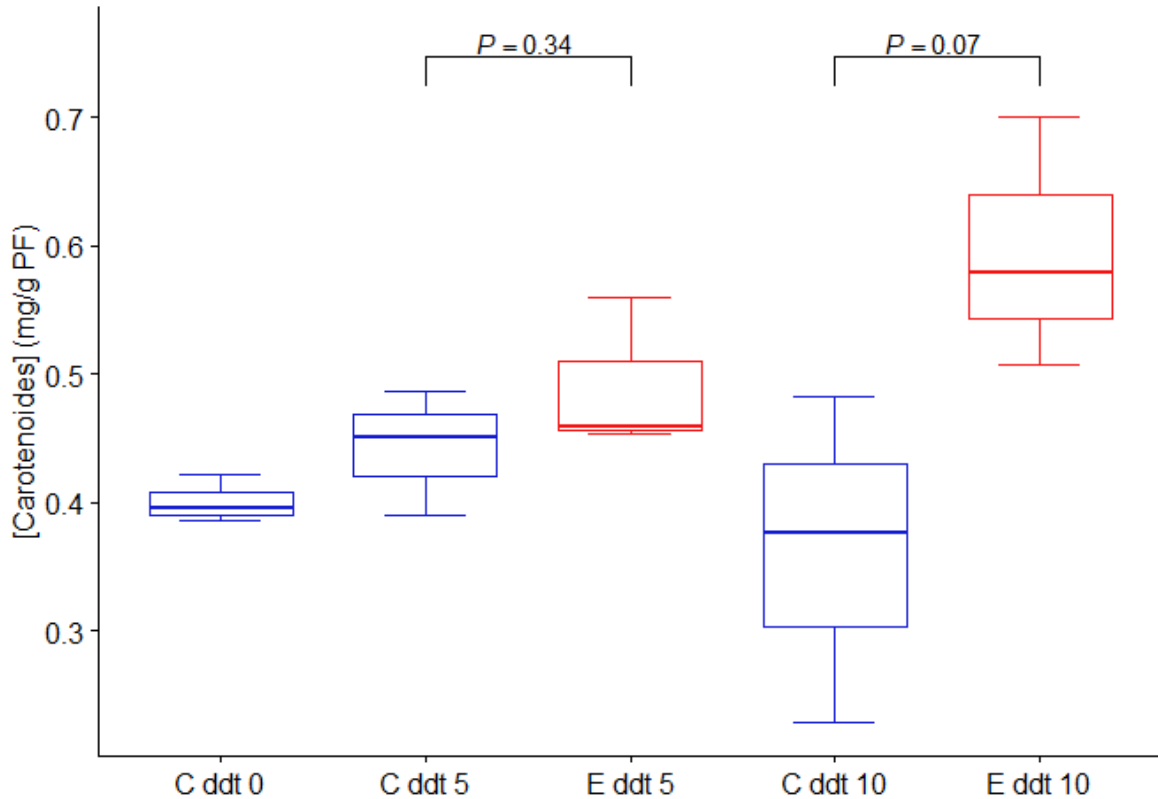


Figura 9. Cambios en el contenido de Carotenoides (mg/g PF), a los 0, 5, 10 días después de tratamiento de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Tukey. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 3$.

Fluorescencia de la clorofila

Dentro de los distintos valores que se pueden obtener con el fluorómetro no modulado, la Eficiencia máxima cuántica del fotosistema II (F_v/F_m) es uno de los primeros valores en analizarse. Como se observa en la Figura 10 no se encuentran diferencias entre los tratamientos dentro de los distintos puntos de muestreo, y los valores se mantienen similares a lo largo del tiempo, variando en un rango de 0,79 a 0,83. Estos datos siguen una distribución normal, con homocedasticidad y aleatoriedad.

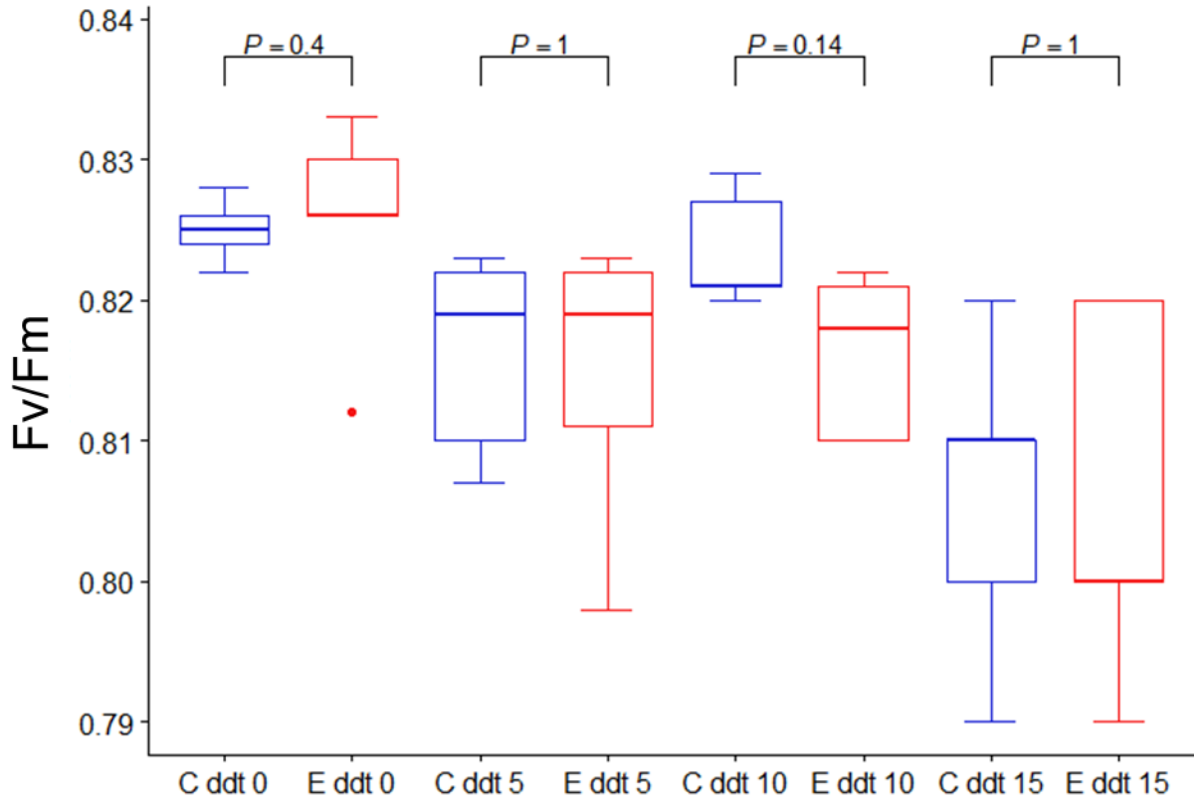


Figura 10. Cambios en el Eficiencia cuántica del PSII (F_v/F_m), a los 0, 5, 10, y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.

El Índice de desempeño PI_{ABS} (Figura 11), similar a lo observado con la F_v/F_m , se mantiene constante durante los tres primeros puntos de muestreo y no muestra diferencias significativas entre los tratamientos con la prueba de Wilcoxon con $p < 0,05$. Sin embargo, para el ddt 15 se puede observar una disminución en los valores de PI_{ABS} , donde se tienen diferencias significativas entre el tratamiento y control ($p < 0,05$). Los valores para los primeros días se mantienen en un rango de variación similar entre los puntos de muestreo, manteniéndose entre 1- 3,8; mientras que para el ddt 15 el rango esta entre 0,7-2.

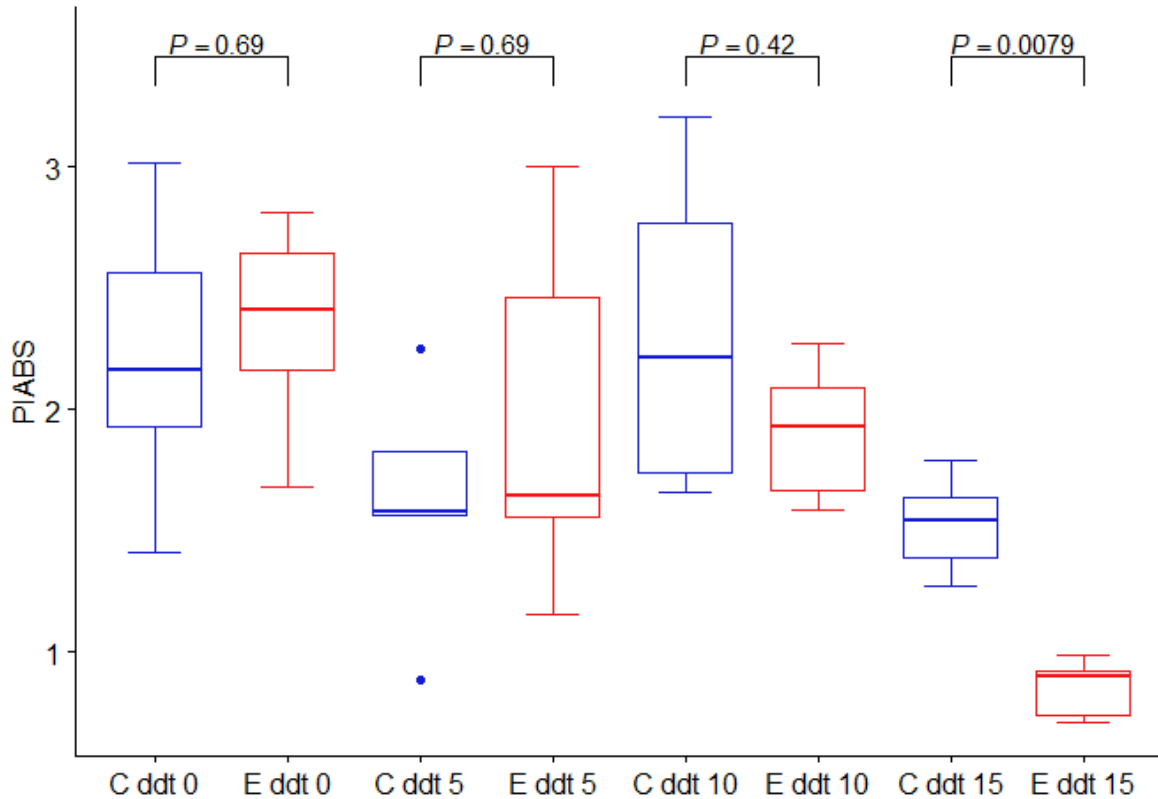


Figura 11. Cambios en el índice de desempeño (PI_{ABS}), a los 0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. C control, E estrés. Se muestra el valor p para indicar presencia o no de diferencias significativas entre los tratamientos para cada punto de muestreo, $p < 0,05$ indica diferencias según la prueba de Wilcoxon. Las barras representan la desviación estándar de la media con un $n = 5$.

Como se mencionó anteriormente, las variables asociadas a la fluorescencia de la clorofila a son varias, por lo que tras haber realizado el análisis separado sobre F_v/F_m y PI_{ABS} se tomó la tabla de datos obtenida con el fluorómetro, en donde se tiene un total de 53 variables. Se realizó un análisis de componentes principales PCA, en búsqueda de aquellas variables que expliquen en mayor medida la varianza de los datos. En la figura 12 podemos observar los valores propios asignados a cada uno de los componentes. El componente 1 tiene un valor propio de 54,6 y el componente 2 de 15,3, lo que agrupa alrededor del 70% de la varianza total.

En la Figura 13 se puede apreciar gráficamente el PCA, donde se observa una agrupación de las variables a lo largo de la componente 1; a su vez se puede apreciar que no hay una agrupación correspondiente a cada uno de los tratamientos y puntos de muestreo estudiados.

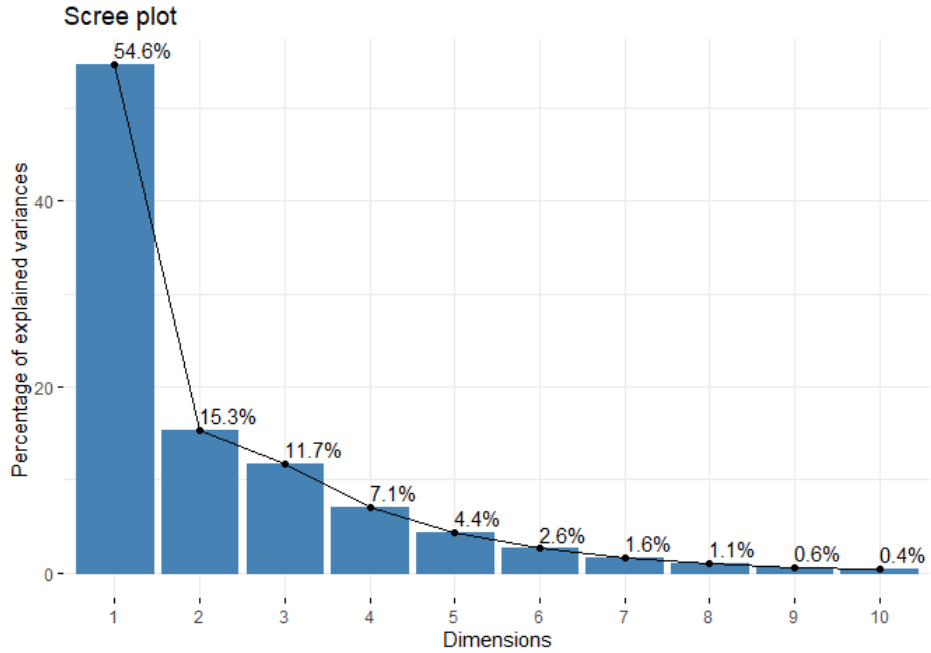


Figura 12. Diagrama de barras de los valores propios para el Análisis de componentes principales con las variables asociadas a la fluorescencia de la clorofila a.

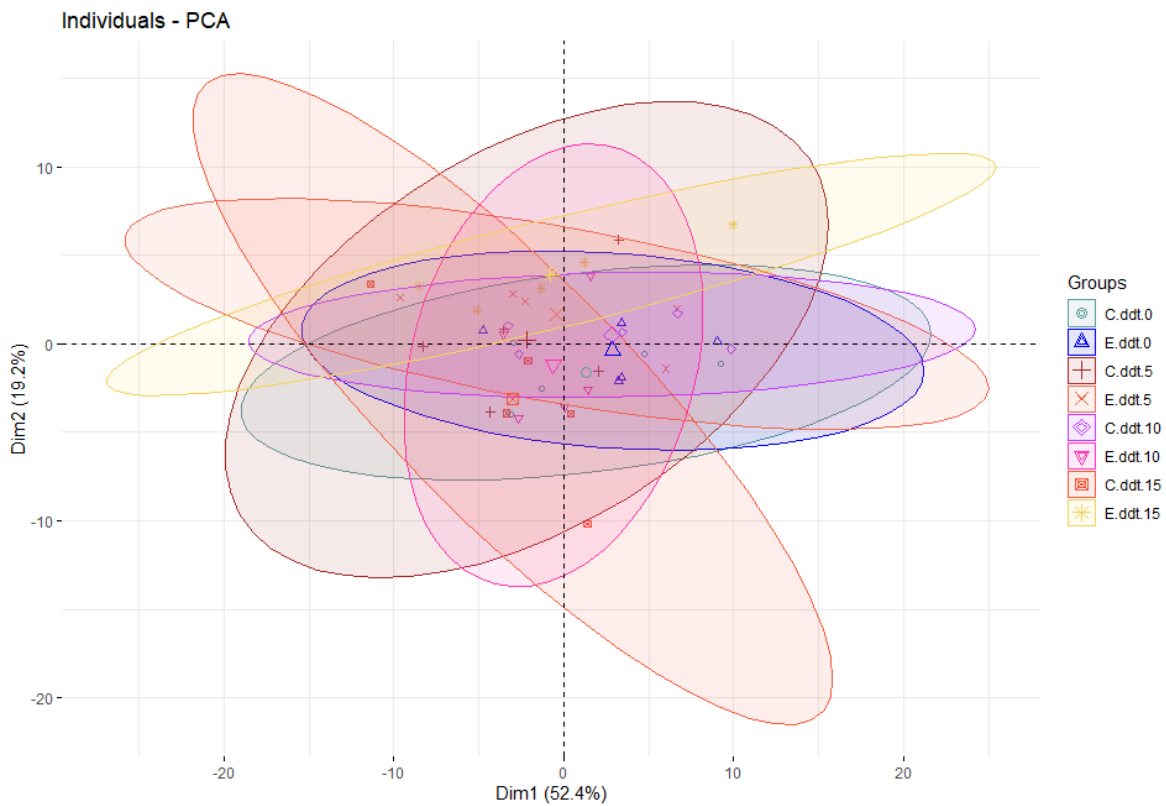


Figura 13. PCA (Análisis de componentes principales) de los individuos con agrupación por tratamiento para cada punto de muestreo.

Teniendo en cuenta que gráficamente no se observó agrupación de los individuos, ni influencia por parte de las variables en su distribución se procedió a realizar un control de calidad sobre los datos de los distintos individuos para las variables que corresponden a los primeros componentes, en donde se determinó que contaban con homocedasticidad y aleatoriedad, pero no con normalidad. Se hizo un análisis de varianza no paramétrico con la prueba de Wilcoxon para determinar diferencias entre los tratamientos. Para las dos variables y en los 4 puntos de muestreo se obtuvieron valores de $p > 0,05$, por lo que se confirmó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos para las variables relacionadas con la fluorescencia de la clorofila a.

Se prosiguió a realizar la curva de intensidad de la fluorescencia normalizada por la fluorescencia basal F_0 (Fig. 14); en esta curva se pueden observar 4 inflexiones principales sobre la cinética de la fluorescencia de la clorofila a de los cuales recibe su nombre, curva OJIP (Gaudio-Gomes et al., 2012). La cinética de la curva es muy similar entre los tratamientos y como se observa en la figura 14 B, desde el ddt 5 hay una tendencia de los valores del tratamiento bajo estrés a ser mayores tras el punto J de la curva; esto se ve con mayor claridad en Figura 14 C; sin embargo, para el ddt 15 no se observan claramente las diferencias entre los tratamientos. De igual forma, los valores de la fluorescencia se mantienen dentro de los mismos rangos para todos los puntos y tratamientos.

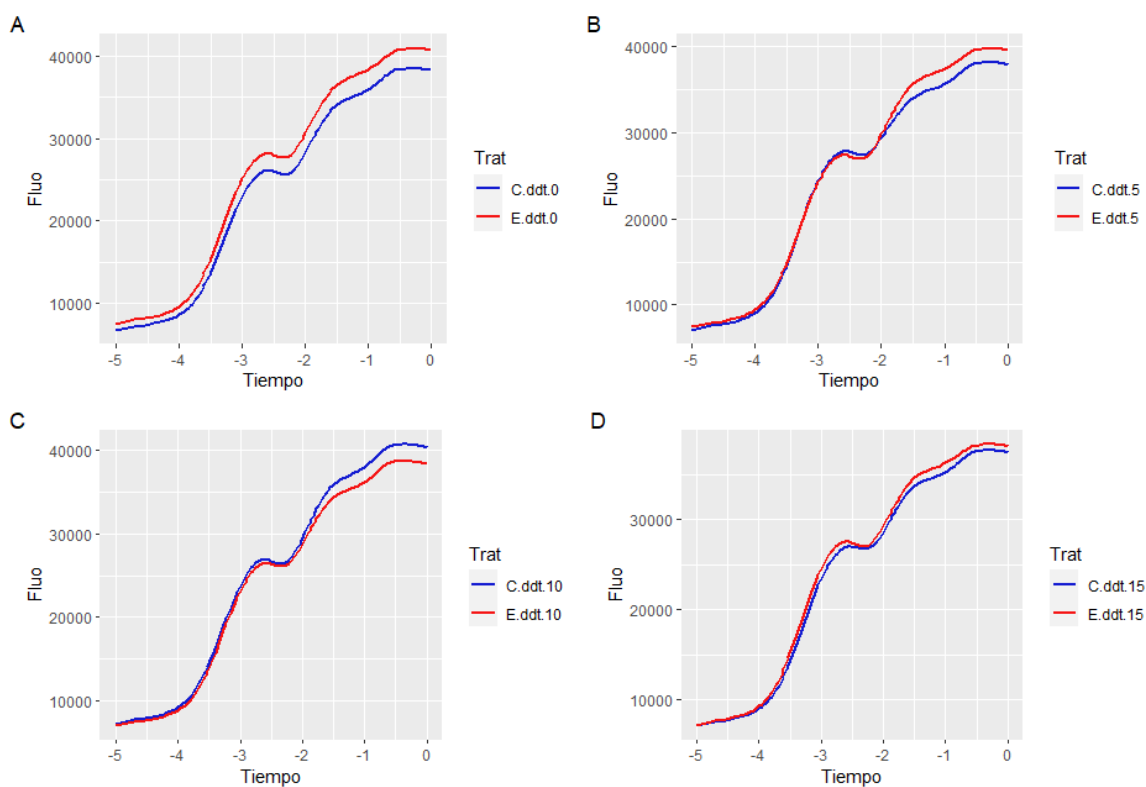


Figura 14. Curva OJIP (Intensidad fluorescencia vs logaritmo del tiempo (ms)) en plantas de gulupa. C control, E estrés. Los valores son el promedio de 5 individuos por tratamiento. C control, E estrés. A. ddt 5, B. ddt 5, C. ddt 10, D. ddt 15

Reflectancia

En la figura 15 se observa la curva de reflectancia para los individuos pertenecientes a control y a estrés. Se encuentra que para las plantas estresadas los valores de reflectancia son ligeramente más altos que los de control.

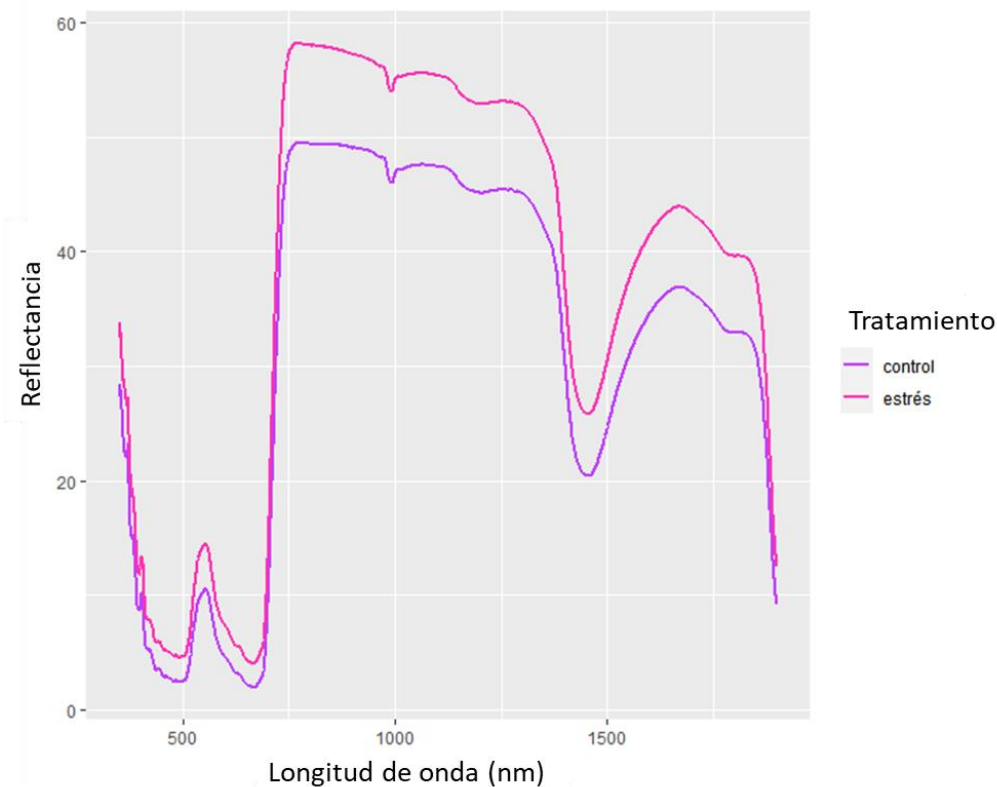


Figura 15. Huella espectral de plantas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) dentro del rango de longitudes de onda de 450 a 2500 nm. Cada curva corresponde al promedio de 5 individuos para el ddt 15.

Por otra parte, con los valores de reflectancia se realizó la obtención de distintos índices que se observan en la tabla 2 para los individuos control y estresados.

Tabla 2. Resultados para índices de vegetación (VIs) para el ddt 15

Tratamiento	$\text{NDVI} \left(\frac{\text{R800} - \text{R680}}{\text{R800} + \text{R680}} \right)$	$\text{PRI} \left(\frac{\text{R531} - \text{R570}}{\text{R570} + \text{R531}} \right)$	$\text{SIPI} \left(\frac{\text{R800} - \text{R445}}{\text{R800} + \text{R680}} \right)$	$\text{ARI} \left(\frac{1}{\text{R550}} - \frac{1}{\text{R700}} \right)$	$\text{WBI} \left(\frac{\text{R900}}{\text{R970}} \right)$
Control	0,904	0,029	0,884	-0,012	1,018
Estrés	0,863	0,024	0,844	-0,007	1,019

Se obtuvo el índice NDVI que se relaciona con la biomasa y el área foliar. Como se observa en la tabla 2 los valores más altos de NDVI se encuentran en el control y estos se tienen dentro del rango descrito para este índice entre -1 a 1 (Lichtenthaler et al., 1996), pero no se tienen diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis con respecto a las plantas estresadas.

Los dos siguientes índices se relacionan con el ciclo de las xantofilas (PRI) y con el contenido de fotopigmentos SIPI (Carotenoides y clorofila a), respectivamente. Los valores del PRI y SIPI se ven levemente menores para las plantas bajo estrés, pero no son significativamente diferentes a las plantas control según la prueba de Kruskal-Wallis. ARI es un índice que se relaciona con la concentración de antocianinas, esta muestra valores mayores para los individuos estresados, pero no hay diferencia significativa con respecto al control según la prueba de Kruskal-Wallis. Finalmente, el índice WBI, que hace referencia al estado hídrico de la planta, no muestra diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Discusión

En este capítulo se estudió la influencia que tiene el déficit hídrico sobre ciertas variables relacionadas con la fisiología de plantas de gulupa. La baja disponibilidad hídrica al ser censada genera cambios directa e indirectamente en la planta, y estas distintas respuestas son una serie de eventos mediados por la transducción de señales que puede ser observable en un corto o largo plazo, dependiendo de la variable y especie estudiada. Generalmente los cambios a corto plazo suelen ser fisiológicos, mientras aquellos que toman tiempo son los morfológicos y suelen proveer características adaptativas (Maseda & Fernández, 2006). La conductancia estomática es reconocida por ser el primer cambio fisiológico observable en plantas sometidas a déficit hídrico, proceso que se da debido a la disrupción en el flujo de agua en el continuo suelo-planta-atmósfera (Dubois & Inzé, 2020). Este es considerado un rasgo propio de la estrategia de evasión, pues permite a las plantas mantener el estado hídrico, pero limita la toma de CO_2 (Comstock, 2002). Como se ve en la Figura 3, desde el ddt 5 se observan diferencias significativas entre el control y tratamiento en la conductancia estomática (gs) de las plantas de gulupa, que se van haciendo más pronunciadas con el decaimiento del porcentaje agua disponible en el suelo (Figura 16).

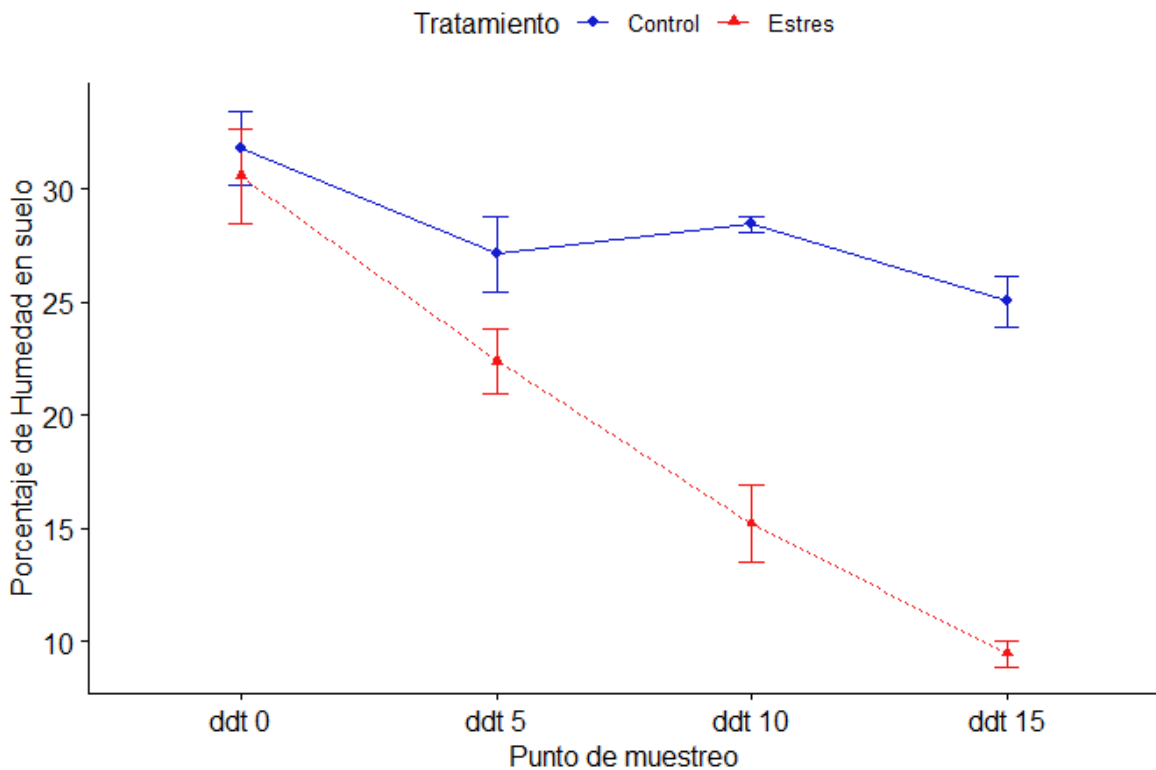


Figura 16. Cambios en el Porcentaje de humedad en suelo a los 0, 5, 10, 15 días después de tratamiento (ddt) de déficit hídrico. Las barras representan la desviación estándar de la media con un n = 5.

El comportamiento que se observa corresponde a aquellas especies que controlan la apertura estomática en respuesta a señales químicas, estas señales son emitidas por las raíces en búsqueda de mantener el potencial hídrico y es conocido como Comportamiento Isohídrico (Yang et al., 2021). En un estudio realizado por Ma et al., (2015) en árboles de manzana tras 15 días de déficit hídrico presentaron reducción en la tasa fotosintética y en la tasa de transpiración, pero fue en los días posteriores cuando la escasez de agua se intensificó y donde hubo una afectación en la actividad de la enzima RuBisCO y en la eficiencia máxima potencial del fotosistema II (Fv/Fm).

La limitación estomática es una de las causas principales en la disminución de la tasa fotosintética bajo déficit medio, esto se relaciona directamente con la baja disponibilidad de CO₂ (Yang et al., 2021). Distintos estudios han reportado que el estrés por déficit hídrico tiene un efecto negativo sobre la tasa fotosintética, se ha encontrado que la fotosíntesis se ve limitada por diferentes procesos, estomáticos y no estomáticos (Zhuang et al., 2020). En este experimento, aunque no tenemos medidas directas de fotosíntesis se puede inferir con las demás variables medidas.

La utilización de la energía lumínica por el aparato fotosintético se puede ver comprometida por la baja disponibilidad de agua, esto genera cambios en la distribución usual de la energía, por lo que se ve un aumento en la disipación por los canales no fotoquímicos: re-emisión como fluorescencia y energía térmica (Mehta et al., 2010). Como se observa en la figura 4, desde el ddt 5, hay un aumento en la temperatura foliar en el tratamiento bajo estrés respecto al control, que podría ser interpretado como una disipación de energía a través de la generación de calor.

A su vez, se puede explicar por el cierre estomático que conlleva a un aumento en la temperatura foliar, dado que el proceso de transpiración es el principal factor de control de la temperatura (Farooq et al., 2009). El incremento en la temperatura puede generar procesos de desnaturalización de proteínas especialmente de enzimas; además de posibles alteraciones en la fotosíntesis, respiración, toma de iones, así como otros procesos metabólicos (Bhargava & Sawant, 2013).

Por otra parte, el cierre estomático puede causar un desbalance en las fases de la fotosíntesis, contribuyendo a la formación de especies reactivas de oxígeno que llegan a

comprometer la estabilidad de los cloroplastos, generando de esta manera alteraciones en la utilización de la energía (Raja et al., 2017). Como se puede observar en la figura 10, en nuestro experimento no se encontraron diferencias significativas entre la eficiencia cuántica del PSII (Fv/Fm) del tratamiento y del control, es decir no hay reemisión diferencial de fluorescencia de la clorofila que se pueda atribuir a un efecto del déficit hídrico, por lo que se infiere que no hay, en este punto del experimento, daños en el aparato fotosintético ni en la eficiencia del PSII.

Yi et al., (2016) reportan que bajo estrés por déficit hídrico severo se presenta limitación de la fotosíntesis no estomática, que afecta la funcionalidad del PSII en plantas de algodón, y esto genera valores menores de Fv/Fm que los obtenidos en nuestro estudio. Para gulupa, todos los tratamientos mantienen los valores de Fv/Fm alrededor de 0,82, lo que corresponde a valores esperados para plantas sanas, según lo reportado por (de Brito et al., 2011).

Gomes et al., (2012) reportan que para dos cultivares de Maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) tras 10 días de déficit hídrico progresivo se presentaron diferencias significativas en Fv/Fm entre el control y el tratamiento, teniendo valores menores a 0,75 para las plantas sometidas al déficit, y que tras la rehidratación lograron recuperar valores similares al control. Este comportamiento se asocia con que las plantas no cuentan con la capacidad suficiente de protección frente al estrés, como si se ha presentado en otros estudios (Souza et al., 2018).

En los últimos años la fluorescencia de la clorofila se ha utilizado como marcador del efecto del estrés sobre el aparato fotosintético (Ahmad et al., 2018; Xu et al., 2015). Valores bajos de Fv/Fm indican una subutilización de la energía para el proceso fotoquímico, así como en la ausencia de cambios en PI_{ABS} (Figura 11) y en las demás variables relacionadas con la fluorescencia. En la figura 13 el análisis de componentes principales con las distintas variables asociadas a la fluorescencia de la clorofila no muestra cambios entre los distintos tratamientos en cada punto de muestreo.

Zhuang et al., (2020) reportan que la disminución en los valores asociados a la fluorescencia de la clorofila de plantas expuestas a déficit hídrico está asociado a una reducción en la concentración de clorofila, que a su vez está relacionado con la capacidad fotosintética. En nuestro estudio, como se puede observar en la Figura 8 durante los 15 días de tratamiento no hay cambios en la concentración de clorofila en las plantas bajo tratamiento de estrés en comparación al control. Según de Brito et al., (2011) no presentar cambios en la

concentración de clorofila está asociada a la estabilidad del PSII bajo tratamientos de déficit hídrico.

La clorofila está siendo continuamente metabolizada en plantas, y es un estimador de la capacidad fotosintética y la producción (Farooq et al., 2009). En un estudio de déficit hídrico realizado en 13 variedades de trigo, se observó la diferencia que existe entre las variedades susceptibles y resistentes, donde en estas últimas los valores de contenido de clorofila permanecían estables a diferencia de las variedades susceptibles (Zaefyzadeh et al., 2009). En un estudio similar en avena, se observó la disminución en el contenido de no solo clorofila, si no también otros fotopigmentos como carotenoides (Wu et al., 2013). Esta disminución en el contenido puede darse por la dificultad de tomar micronutrientes del suelo por el cierre estomático, por lo que el mantener el contenido de clorofila en condiciones de estrés es un signo de tolerancia (Yang et al., 2021).

En general, la curva de cinética de fluorescencia de la clorofila *a* tiene una fase de incremento rápido durante el primer segundo del pulso de luz, que viene seguida de un declive gradual de la fluorescencia durante los siguientes minutos. Esta primer fase rápida se conoce como OJIP, y tiene cuatro inflexiones cuando se grafica contra el logaritmo del tiempo (Figura 14), la primera inflexión conocida como O es el valor mínimo de la fluorescencia (F_o) la cual aparece alrededor de los 50 μ s, la segunda inflexión conocida como J aparece a los 2 ms, la tercera inflexión se conocen como I que se desarrolla a los 20 ms y la cuarta inflexión como P que es la fluorescencia máxima (f_m) que se aparece aproximadamente alrededor del segundo 1 (Moreno et al., 2008).

La comparación de las curvas OJIP para nuestros tratamientos en cada punto muestran la cinética típica descrita anteriormente, y que desde el ddt 5 se puede observar una tendencia a mayores valores de fluorescencia en el tratamiento de déficit hídrico después del punto J de la curva; lo que significa que hay una reducción en el transporte de electrones.

Según Moreno et al., (2008) en este punto los centros de recepción de electrones, quinona A, ceden los electrones a la quinona B, comenzado su proceso de reducción. Un aumento en los valores de la región J-P se atribuyen a una reducción en el transporte de electrones (Kalaji et al., 2016) por lo que se podría deducir que el déficit hídrico en las plantas de gulupa está causando interferencias en el transporte de electrones y dificultando la vía fotoquímica de la fotosíntesis; sin embargo, como se mencionó anteriormente no hay diferencias significativas en los valores de F_v/F_m entre los tratamientos y estos se encuentran cercanos a 0,82 por lo que no hay indicios de fotoinhibición (Figura 10) (Lawlor & Cornic, 2002).

Distintos autores aseguran que los parámetros asociados a la curva OJIP son potenciales indicadores de desbalances en el PSII y en la cadena de transporte de electrones (Arslan et al., 2020). Al analizar estas variables entre los tratamientos encontramos que no hay variación entre los tratamientos PCA (Figura 13), y aquellas variables que cargan el mayor porcentaje de variación no cuentan con diferencias significativas entre los tratamientos.

A su vez, al comparar los valores de PI_{ABS} , variable que expresa de manera global la absorción, atrapamiento y conversión de la energía en el PSII, y que se reporta como sensible frente a condiciones ambientales adversas (Bano et al., 2021) ; Kalaji et al., 2016), no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los puntos de muestreo, como si se ha reportado para otros estudios en donde se presentan valores menores de PI_{ABS} en variedades sensibles al déficit hídrico (Çiçek et al., 2019; Kalaji et al., 2016; Zivcak et al., 2017).

Lauriano et al., (2006) aseguran que el fotosistema II cuenta con una capacidad de resistencia a las condiciones adversas causadas por la falta de agua en comparación al fotosistema I, y alteraciones en él ocurren únicamente bajo condiciones extremas de sequía. Bajo condiciones de sequía o de déficit hídrico se aumentan los procesos productivos de los fotosistemas y se opta por ajustar la distribución de energía (Zivcak et al., 2013), y pese a que no se observan cambios significativos durante los primeros 15 días de corte de agua en Gulupa, la medición de la fluorescencia de la clorofila es un método útil para proyectar el efecto del estrés en plantas cuando no hay cambios visibles (Guha et al., 2010), como se observa en otros estudios en donde ha sido posible diferenciar variedades susceptibles y resistentes a sequía utilizando los parámetros asociados a la curva OJIP (Oukarroum et al., 2012; Strauss et al., 2006).

Para plantas del género *Passiflora*, (Gomes et al., 2012) reportaron que el fotosistema de las plantas sometidas a déficit progresivo presentó un aumento en los valores de todos los puntos de la curva OJIP, que se puede ver explicado por una disminución en el transporte de electrones tras la quinona A. Como ya se mencionó anteriormente, esto está relacionado con el hecho de que el PSII es más tolerante al déficit hídrico que el PSI, así que el efecto del déficit se observa en la baja eficiencia de transporte de electrones hacia el PSI (Redillas et al., 2011). A su vez las plantas del experimento de (Gomes et al., 2012), que fueron sometidas a recuperación, no mostraron una recuperación total del fotosistema, perdiendo la capacidad de reducir completamente la quinona A.

Por otra parte, la figura 15 muestra las curvas de reflectancia o huella espectral para los distintos tratamientos. La huella espectral de una planta habla de su estado en un momento específico, por lo que bajo condiciones de estrés estos cambios pueden ser usados para estimar el impacto (Pinter et al., 2003). Según lo obtenido en la Figura 15 donde se ve las curvas espectrales para cada uno de los tratamientos en el último día de muestreo, existen diferencias en los valores de reflectancia entre los tratamientos, teniendo valores más altos para las plantas estresadas en comparación al control.

Con respecto a lo reportado en otros estudios, Caturegli et al., (2020) llevaron a cabo un estudio sobre los efectos de déficit hídrico sobre la reflectancia en una especie de pasto, encontraron que las curvas espectrales, al igual que nuestras plantas de gulupa, presentan un aumento en los valores de reflectancia en plantas estresadas; para este punto de muestreo (15 ddt) la disponibilidad de agua en el suelo para nuestras plantas de gulupa del tratamiento de estrés se encontraba en 9,5%, a diferencia del 21,3% de agua disponible para las plantas control.

En la figura 15, al igual que en lo reportado por Caturegli et al., (2020), hay cuatro puntos notorios o depresiones de reflectancia en el rango de 750 a 2500 nm, estos están ubicados aproximadamente en 970, 1175, 1450 y 1950 nm (Jiang & Carrow, 2007). En las cuatro longitudes de onda mencionadas se presentan descensos en los valores de reflectancia. Otros estudios, en otras especies, se han reportado comportamientos similares para las mismas longitudes de onda en estudios de déficit hídrico (González-Fernández et al., 2015; Rallo et al., 2014), sugiriendo que estos presentan una relación con el estado hídrico de las hojas.

Zhou et al., (2021) encontraron que, tras 20 días bajo déficit hídrico medio, arboles de limón presentaban valores de reflectancia menores en longitudes de onda cercanas a 450 nm y 660 nm, pero con un déficit más severo la reflectancia incrementaba respecto al control, principalmente en las longitudes de onda menores a 1420 nm. Por otra parte, Meza et al. (2020), reportaron que bajo condiciones de estrés el pepino presenta valores menores de reflectancia en condiciones de déficit, lo que se relaciona con los niveles de clorosis en las hojas; a su vez reporta que para el rango entre 800-1000 nm las plantas sanas presentan valores mayores de reflectancia. Como se ve en la Figura 15 para la gulupa esto se podría asociar a una respuesta de tipo tolerante, con la acumulación de solutos compatibles.

Son pocos los reportes sobre análisis espectrales de plantas del género *Passiflora*. Fernandes et al. (2020), realizaron un estudio sobre los cambios en las señales espectrales en diferentes estados de desarrollo de hojas de *Passiflora edulis* Sims. Según lo descrito por

dichos autores, se presentan cambios en los valores de reflectancia de los distintos estados de desarrollo de las hojas, lo que fue comparado con datos de concentración de fotopigmentos y con la obtención de distintos índices de vegetación, reportando que los índices NDVI y WBI son de los que más aportan a la variación entre los estados de desarrollo.

Sterling & Melgarejo, (2020) encontraron que, para los índices empleados en su estudio en plantas de caucho, existe una diferencia en el tiempo de presencia del estrés para generar cambios. Esto se observa en la tabla 2, donde para los distintos índices calculados hay aquellos que se encuentran más alejados entre sí que otros para cada tratamiento.

Sin embargo, cada índice indica algo distinto y en este caso se realizó el cálculo de 5 índices. El NDVI es uno de los índices de reflectancia más comunes y se relaciona con el estado de la planta y se utiliza como indicador de estrés (Jiang & Carrow, 2007). Caturegli et al. (2020), encontraron una disminución progresiva en los valores de NDVI con respecto a la baja disponibilidad de agua en el suelo, al igual que Zhou et al., (2021). Este índice a su vez se ha relacionado con las propiedades biofísicas de la planta como área foliar y biomasa fresca, por lo que su interpretación se hace de la mano con el estado de biomasa en hojas y de contenido de clorofila (Fernandes et al., 2020).

PRI permite estimar la eficiencia en el uso de la luz, detectando cambios en la epoxidación de pigmentos del ciclo de las xantofilas, que cambian rápidamente en respuesta a las condiciones ambientales (Frank & Brudvig, 2004). El índice SIPI indica la proporción total de foto pigmentos en relación con la clorofila, teniendo en cuenta los cambios estructurales que se pueden presentar (Peñuelas & Inoue, 1999), y a ARI que es el índice de reflectancia de antocianinas.

Estos tres índices no tuvieron diferencias significativas entre estrés y control en nuestro experimento; sin embargo, muestran una tendencia a tener valores menores. Zhou et al., (2021) encontraron que PRI es un índice más sensible a estrés temprano debido a su relación con procesos fotosintéticos, aunque en nuestro trabajo no se observó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos. Según lo reportado por Fernandes et al., (2020), estos índices son buenos indicadores de la concentración de fotopigmentos en hojas de maracuyá.

Finalmente, WBI no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Este índice muestra específicamente el contenido hídrico del tejido vegetal, por lo que las plantas estresadas de gulupa no presentarían una reducción en las condiciones hídricas de la hoja para el ddt 15. Zhou et al., (2021) encontraron que WBI presenta mejores relaciones con el

contenido hídrico foliar tras la degradación de la clorofila, cuya absorbancia puede influir en los valores de WBI, siendo capaz de detectar el estrés antes que índices como NDVI.

Las plantas de gulupa no muestran diferencias significativas en la comparación de los 5 índices estudiados; pero si se encuentran valores menores en las plantas estresadas que a su vez podría asociarse a que 15 días de estrés no fueron suficientes para que la planta presentara cambios fisiológicos notorios debido a la naturaleza de su mecanismo de respuesta (Lozano-Montaña et al., 2021), teniendo que para este último punto las plantas no han llegado al punto de inicio de la fase agotamiento y están llevándose a cabo procesos para resistir el déficit hídrico.

Esta ausencia de cambios en las distintas variables asociadas a fluorescencia de la clorofila a y a contenido de clorofila, se pueden extrapolar a un mantenimiento de la tasa fotosintética que está mediado por el tipo de respuesta que tienen las plantas (Bhargava & Sawant, 2013; en el caso de la gulupa el evitar cambios en los procesos al mantener el estado hídrico de la planta probablemente pertenece a la estrategia de tolerancia (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam, 2016), que en conjunto con otras estrategias bioquímicas y moleculares podrían conllevar a tolerancia al estrés. De igual manera, la respuesta de las plantas es un proceso complejo que varía en un rango de eventos fisiológicos, morfológicos, fenológicos, bioquímicos y moleculares (Nezhadahmadi et al., 2013) por lo que algunos autores consideran que las plantas responden al estrés con una combinación de las estrategias (Alam Khan et al., 2013).

Conclusiones

Dentro de los 15 días del experimento se pudo observar que la baja disponibilidad hídrica, menos del 10% de humedad en el suelo, genera rápidamente cierre estomático y aumento en la temperatura foliar; pero, otras variables relacionadas con el estado del fotosistema, fluorescencia de la clorofila a y contenido de clorofila permanecen estables, así como la huella espectral, lo que sugiere una capacidad evitativa, al menos, al nivel de estrés al que se encuentra enfrentada.

Estos resultados están principalmente enfocados en la pronta respuesta al déficit hídrico. Donde se encuentran cambios en la expresión de diferentes genes relacionado con gran variedad de procesos, esto previo a presentarse cambios en las variables fisiológicas medidas. Esto habla de cómo los cambios a nivel molecular se presentan con anticipación, incluso de días, de los procesos fisiológicos que median.

Se observaron varios rasgos de evitación al estrés por déficit hídrico en las plantas de gulupa, estos rasgos buscan evitar la pérdida de agua y permitir el funcionamiento de los procesos metabólicos de la planta; sin embargo, debido a la capacidad de mantener constante el contenido de ftopigmentos es posible que las plantas de gulupa cuenten con ciertas características del mecanismo de respuesta tolerante, lo que se debe estudiar más a profundidad analizando la acumulación de solutos compatibles.

Capítulo 2

Estudio de la expresión diferencial de genes durante la respuesta a estrés por déficit hídrico en plantas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) en estado vegetativo.

Abstract

The gulupa crop in Colombia has gained importance in recent years, its production and exports continue to grow, as well as investment in it. The water deficit generated because of climate change is a threat to the production of this and other crops. The mechanisms of response to changing environmental conditions are mediated by changes in the transcriptome of an individual, these changes can lead to revealing resistance strategies mediated by the expression of response genes, for gulupa these mechanisms are poorly known, so, with the help of next-generation sequencing (NGS) tools, we analyzed the changes in the transcriptome of gulupa leaves in response to water deficit treatment. When comparing control versus treatment plants, it was found that the changes in expression are related to those observed at the physiological level. And that transcriptional modulation is focused on terms of ABA signaling, growth, and modulation of reactive oxygen species, and the antioxidant system that leads plants to show some tolerance to stress.

Keywords: water deficit; transcriptome; differential expression; ROS; ABA.

Resumen

El cultivo de gulupa en Colombia ha ganado importancia en los últimos años, su producción y exportación siguen creciendo, así como la inversión en este. El déficit hídrico generado como consecuencia del cambio climático es una amenaza para la producción de este y otros cultivos. Los mecanismos de respuesta frente a las condiciones cambiantes del ambiente están mediados por cambios en el transcriptoma de un individuo, estos cambios pueden llevar a revelar estrategias de resistencia mediadas por la expresión de genes de respuesta; para la gulupa estos mecanismos son poco conocidos, por lo que, con la ayuda de herramientas de secuenciación de nueva generación (NGS), se analizó los cambios en el transcriptoma de hojas de gulupa en respuesta al tratamiento por déficit hídrico. Al comparar a las plantas Control contra tratamiento Estrés se encontró que los cambios en la expresión están relacionados con aquellos observados a nivel fisiológico. Y que la modulación transcripcional está enfocada en términos de señalización por ABA, crecimiento y modulación de las especies reactivas de oxígeno y el sistema antioxidante que llevan a las plantas a mostrar cierta tolerancia frente al estrés.

Palabras clave: déficit hídrico; transcriptoma; expresión diferencial; ROS; ABA

Introducción

El cultivo de gulupa se encuentra en 24 de los 32 departamentos de Colombia, cuya producción se ha visto en aumento en los últimos años y se ha posicionado como la tercera especie en fresco más exportada del país. Ha alcanzado producciones anuales de 8.000 ton, siendo sus principales destinos Holanda, Bélgica y Reino Unido (ASOHOFrucol, 2020). El crecimiento de la importancia de este cultivo se ha visto acompañado de la necesidad de estudios sobre su interacción con el ambiente (Hurtado-Salazar, Pereira et al., 2020).

El déficit hídrico es una amenaza para muchos cultivos, presentando una mayor incidencia con el incremento de las consecuencias que acarrea el calentamiento global (Ponce, 2020). Su impacto en el caso particular de plantas de gulupa es negativo sobre el crecimiento, lo que lleva a la disminución en el número y tamaño de frutos (Jiménez et al., 2011). Se ha reportado que este impacto en el crecimiento es un efecto de la estrategia utilizada por la planta para hacerle frente a la baja disponibilidad hídrica (Lozano-Montaña et al., 2021).

Las plantas tienen diversos mecanismos de respuesta frente a la escasez de agua. Estos mecanismos están mediados por una reprogramación transcripcional en donde hay una activación y/o supresión de la expresión de genes, los cuales se conocen como genes de respuesta (Yang et al., 2021). Esta reprogramación lleva a un cambio en la fisiología y desarrollo en la planta (Lamers et al., 2020) como se describió en el primer capítulo.

La reprogramación transcripcional está mediada por la participación de factores de transcripción que con su regulación llevan a la activación o inhibición de vías metabólicas específicas (Rolly et al., 2021). Según lo reportado en estudios de estrés para otras especies, la fitohormona ABA tiene un papel fundamental en la respuesta frente al déficit hídrico pues inicia la cascada de señalización que lleva a respuestas como el cierre estomático (Vanwallendael et al., 2019). Sin embargo, este no es el único camino observado, pues hay genes cuya activación no dependen del ABA y conllevan a otros cambios a nivel fenotípico (Yang et al., 2021).

Con ayuda de tecnologías desarrolladas en años recientes como es la secuenciación de nueva generación (NGS) se ha acelerado el descubrimiento de genes relacionados con procesos de respuesta a estrés (Chen et al., 2014). Estudios de RNA-seq se han hecho en organismos modelo como *Arabidopsis thaliana*, así como en especies no modelo, lo que ha permitido tener gran cantidad de información cuantitativa y de alta calidad sobre la expresión de genes en distintas condiciones (Filichkin et al., 2010).

Por lo que para comprender los mecanismos moleculares de respuesta de las plantas de gulupa durante su exposición a déficit hídrico, se tuvo como objetivo realizar un análisis de expresión diferencial de genes durante el tratamiento de corte de agua y déficit hídrico progresivo en estas plantas, a través del uso de RNA-Seq, comparando con plantas en condiciones de buena irrigación.

Metodología

Tratamiento y toma de muestras

Como se mencionó en el capítulo 1, se sometieron plantas de gulupa a un tratamiento de estrés por déficit hídrico durante 15 días. Se realizaron 4 puntos de muestreo para las variables fisiológicas (0, 5, 10 y 15 días después de tratamiento ddt) y 3 para la toma de muestras para el RNA-seq, para cada tratamiento (control y estrés). Se tomaron hojas de tres individuos escogidos aleatoriamente dentro de cada tratamiento y se conservaron debidamente marcadas en nitrógeno líquido hasta ser almacenadas a -80°C para su posterior procesamiento.

Procesamiento de muestras y extracción de RNA

Las muestras luego de almacenadas a -80°C fueron maceradas con nitrógeno líquido. Se tomaron 100 ng de material macerado y se colocaron en tubos eppendorf debidamente marcados. Al tener todas las muestras maceradas se realizó la extracción de RNA total utilizando el kit de extracción InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (INVITEK), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras el último paso del protocolo, donde se obtiene el RNA en agua libre de RNAsas se midió la concentración de cada muestra junto con valores de absorbancia para determinar la calidad de la muestra (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

De acuerdo con la concentración de cada muestra se utilizaron 500 ng para realizar geles de agarosa al 0,6% para electroforesis y observar la integridad del RNA. Según lo obtenido para cada muestra en cuanto a concentración, los valores de la relación de absorbancia de 260/280nm y 260/230nm, y la integridad de la molécula, se escogieron 12 muestras de 15, 3 de cada tratamiento para cada punto en los 5 ddt y 10 ddt. Estas muestras se prepararon para envío de acuerdo con las recomendaciones de la empresa encargada de la secuenciación (Macrogen, Corea del Sur).

Secuenciación y procesamiento de librerías

Macrogen siguió un flujo de trabajo de 4 pasos que inició con la preparación de las muestras al realizar pruebas de calidad para obtener datos de concentración y RIN. Estas muestras fueron utilizadas para la construcción de librerías con el kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit para realizar la secuenciación con la plataforma Illumina®, la cual fue en

doble sentido con una profundidad de 30'000.000 lecturas. El resumen de cada librería se encuentra en el anexo 1.

Se recibieron las librerías correspondientes para cada muestra y con ayuda del Laboratorio de Biología Computacional de la Facultad de Ciencias se realizó el preprocesamiento de las librerías, el control de calidad, el ensamblaje *de novo* guiado, la anotación contra la base de datos PFAM (Protein Family) y la posterior construcción de las tablas de conteo.

Análisis de expresión diferencial

A partir de los datos de conteo obtenidos para cada librería se construyó una tabla de conteo con un ID_TRINITY. Sobre esta tabla se realizaron filtros; primero se eliminaron aquellas filas que contenían transcritos sin lecturas para ninguna librería, por lo que se pasó de un total de 1,048,575 transcritos a 974,870 transcritos. Posteriormente, se eliminaron aquellas filas repetidas, quedando 230,709 transcritos.

A su vez se dejaron únicamente los transcritos que contaban con correspondencia en la base de datos PFAM y tenían un valor e menor a 0,001 (Alborzi et al., 2017), contra la cual se hizo una primera anotación. En este punto se tenía 73.645 genes. A esta matriz se le eliminaron los genes con lecturas mayores a 100.000 y aquellos que no tenían varianza, por lo que el análisis de expresión se realizó con un total de 73.643 genes.

A partir de la matriz de expresión construida y filtrada se realizó un análisis de expresión diferencial, utilizando el software R. Se escogió la librería DESeq 2 de Bioconductor (Huber et al., 2015; Love et al., 2014). Se evaluó a través de un PCA la agrupación de las librerías según sus respectivos grupos. Con DeSeq2 se corrieron dos análisis comparando los tratamientos en el ddt 5 y 10, evaluando diferencias entre tratamientos al ajustar cada secuencia a un modelo lineal generalizado MLG y probando la hipótesis de expresión diferencial con la prueba de máxima similitud y la corrección de dispersión de apeglm (Zhu et al., 2019). Se escogieron los genes diferencialmente expresados bajo el criterio de FDR o tasa de falsos positivos menor al 10 %, LFC o Log2 Fold Change mayor a 1 o menor a -1, valor $p < 0,05$ (Love et al., 2014).

A partir de las listas de secuencias diferencialmente expresadas para cada punto de muestreo se realizó el respectivo enriquecimiento con la plataforma dcGO (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/dcGO>), en donde se puede realizar una clasificación según la función molecular, el componente celular o el proceso biológico (Fang & Gough,

2013a). El enriquecimiento se realizó por separado para las muestras del ddt 5 y 10. Se tuvieron en cuenta aquellos términos con valor p menor a 0,05 y con FDR menor a 0,05.

Resultados

Tras realizar el protocolo de extracción de RNA se prosiguió a obtener los datos de concentración y calidad de cada muestra. En la tabla 3 se aprecia en las diferentes columnas el ID de cada muestra, la concentración en ng/ μ l, los valores de absorbancia a 260 y 280nm, y la tasa entre la absorbancia a 260/280 y 260/230 nm. En el ID de cada muestra el número acompañante de P corresponde al punto de muestreo (ddt), la C o E al tratamiento (control y estrés, respectivamente), y el número acompañante a la réplica.

Para el primer grupo de muestras, correspondientes al ddt 0 de tratamiento control (P1C1, P1C2, P1C3) se obtuvieron concentraciones mayores a 1100 ng de RNA por microlitro, con valores mayores a 2,0 para las tasas 260/280 y 260/230nm. Por su parte, el segundo grupo correspondiente al ddt 5 de control (P2C1, P2C2, P2C3) y estrés (P2E1, P2E2, P2E3) contó con concentraciones dentro del rango de 202 a 1032 ng RNA/ μ L, y valores de 260/280 y 260/230nm cercanos a 2,0. Las muestras P2C2, P2C3 y P2E2 tuvieron valores menores a 2,0 para la tasa 260/230nm.

Finalmente, para el grupo de muestras correspondiente al ddt 10 de control (P3C1, P3C2, P3C3) y estrés (P3E1, P3E2, P3E3), se obtuvo una concentración mínima de 492 ng RNA/ μ l y máxima de 1147,9 ng RNA / μ l, con valores mayores a 2,0 en la tasa 260/280nm. Las muestras P2E2 y P2E3 fueron las únicas en tener valores menos de 2,0 para la tasa 260/230nm.

Tabla 3. Calidad de muestras de RNA enviadas a secuenciación

Muestra	[RNA] (ng/ul)	260nm	280nm	260/280	260/230
P1C1	1447,7	36,19	17,25	2,1	2,02
P1C2	1910,6	47,76	22,52	2,12	2,23
P1C3	1170,5	29,26	13,90	2,1	2,18
P2C1	621,8	15,54	73,98	2,1	2,15
P2C2	202,8	5,07	24,38	2,08	1,96
P2C3	230,1	5,75	27,64	2,08	1,86
P2E1	697,5	17,47	83,57	2,09	2,05
P2E2	351,7	8,79	41,92	2,1	1,97
P2E3	1032,5	25,81	12,59	2,05	2,02
P3C1	850	10,08	10,08	2,11	2,1
P3C2	1147,9	28,69	13,50	2,13	2,22
P3C3	1163	29,07	13,83	2,1	2,04
P3E1	567	14,17	67,98	2,09	2,03
P3E2	523,7	13,09	63,19	2,07	1,87
P3E3	492,7	12,31	60,67	2,03	1,95

Al realizar el gel de electroforesis (Fig. 17) se encontró con que todas las muestras presentaban 4 bandas, variando la intensidad de cada una. La banda de mayor peso presente en todas los canales corresponde a contaminación de DNA, la segunda y tercera banda corresponden a RNA en 28S y 18 S, respectivamente y la última banda a RNA degradado, 5S.

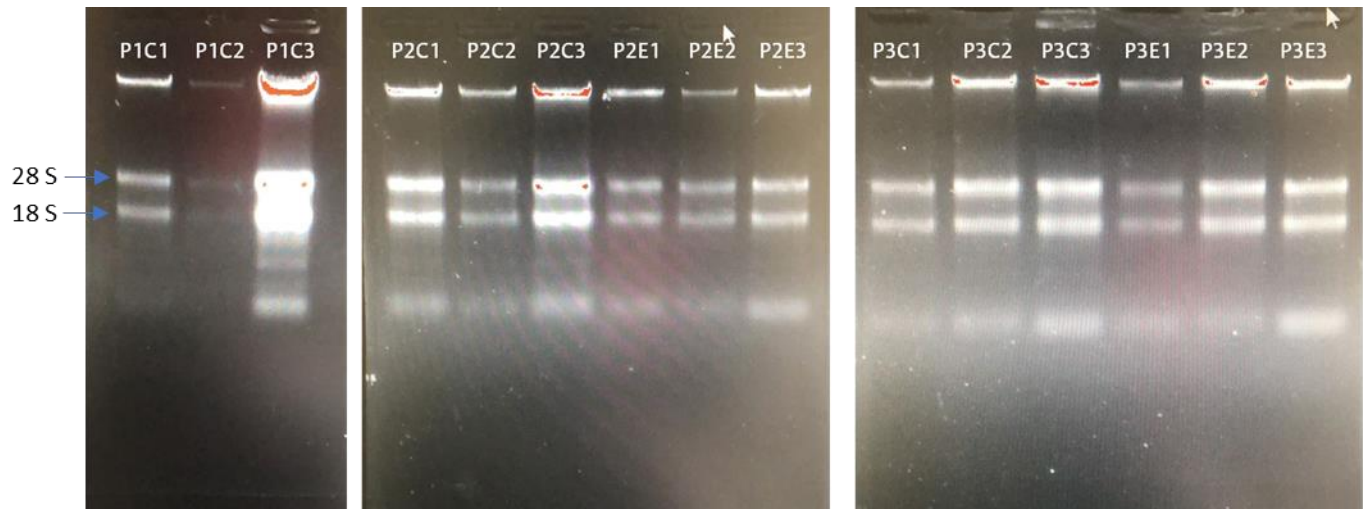


Figura 17. Gel de electroforesis de las muestras usadas para secuenciación.

El resumen de la estadística general de las librerías secuenciadas por Macrogen, previas al procesamiento necesario para el ensamblaje del transcriptoma se pueden observar en el anexo 1.

Análisis de expresión

Se obtuvo una tabla de conteo con el PFAM_ID (Mistry et al., 2021) y el conteo de lecturas para cada librería. A partir de esta matriz de conteo se realizó el análisis de expresión diferencial con la librería DESeq2. Como se observa en la figura 18, al construir un análisis de componentes principales de las librerías, éstas se comportan de manera similar entre los tratamientos designados como control C, tratamiento de Estrés E, y punto de muestreo (ddt), exceptuando las librerías P3C1 y P3E1, que se agrupan entre sí y se separan de sus grupos, por lo que al correr el análisis de expresión diferencial se descartaron estas dos. La primera componente del PCA explica el 16,8% de la variación y la segunda el 13,6%. Cada componente se ve explicada por aquellos genes que otorgan variación entre las librerías.

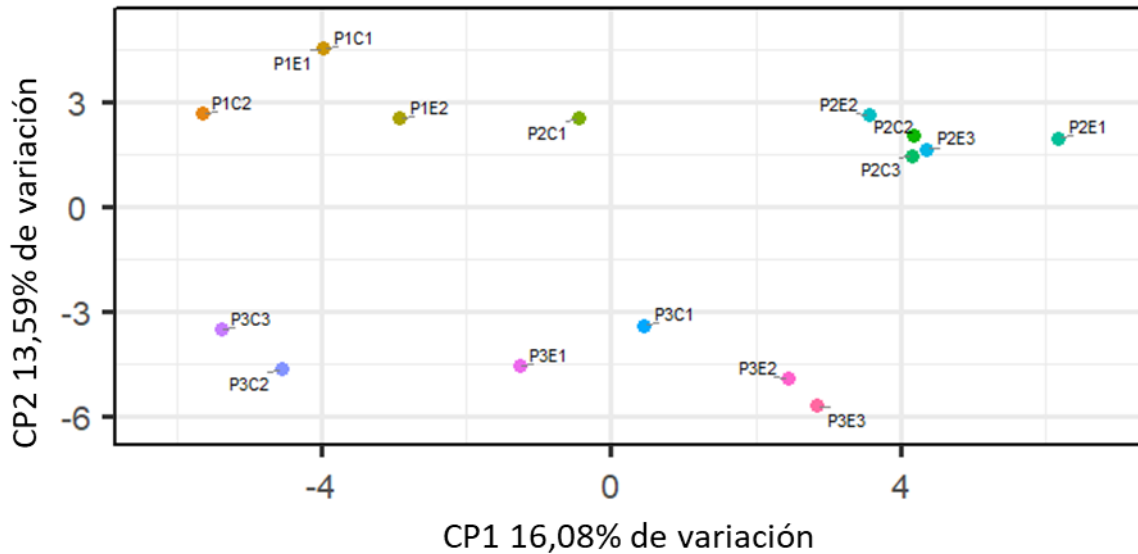


Figura 18. PCA sobre las librerías utilizadas en la tabla de conteo para el análisis de expresión diferencial

Al realizar la comparación del tratamiento con Estrés contra el control en el ddt 5 se obtuvieron un total de 2.450 genes diferencialmente expresados (GDE) de los 73.643 sometidos al análisis, lo que corresponde al 3,4% del total de los genes analizados.

Según lo obtenido en la figura 19 y en la lista de GDE, hay un menor número de genes con un Log Fold change < -1 y valor $p < 0,05$ (1730 en total) ubicados en la parte inferior de la gráfica, comparado con aquellos genes con un log Fold change > 1 y valor $p < 0,05$ (720 en total).

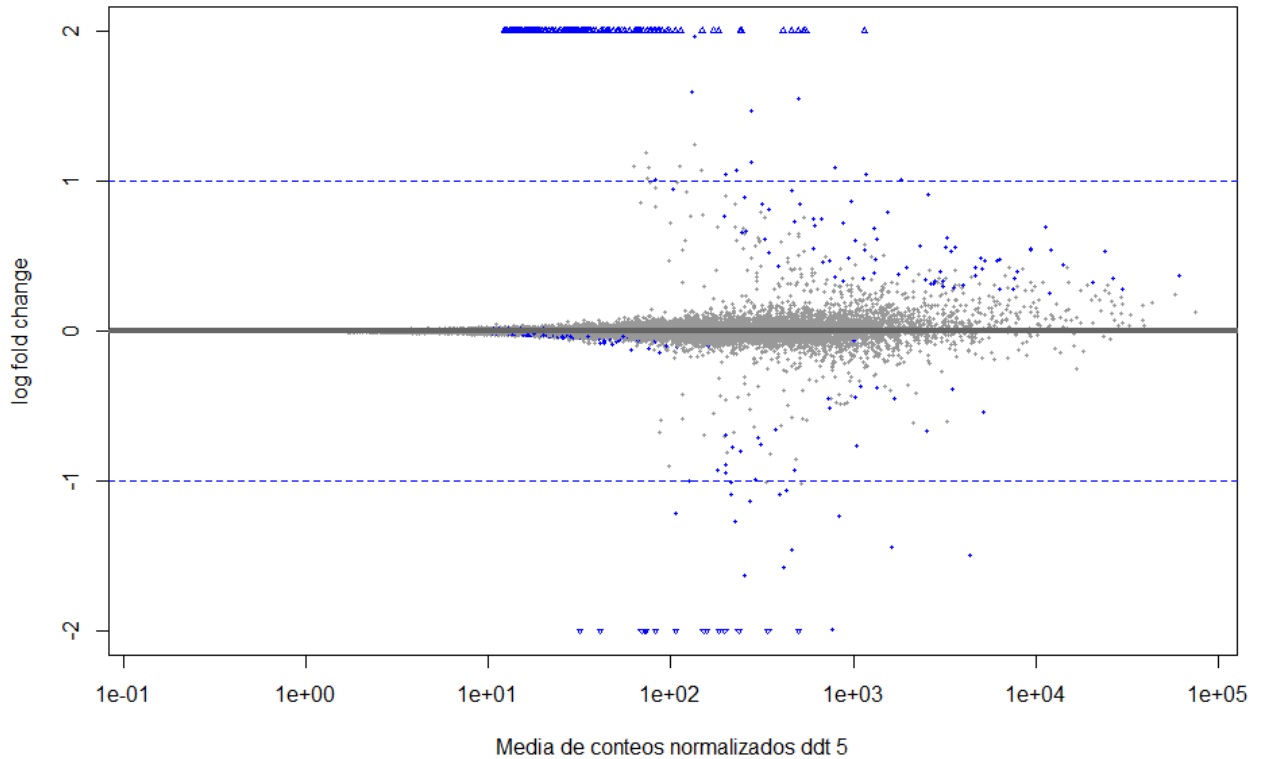


Figura 19. MAplot (Media de conteos normalizados entre tratamientos en el ddt 5 vs log Fold change)

Dentro del total de genes diferencialmente expresados entre los tratamientos para el ddt 5 se encontró que las 4 con menor valor p fueron las observadas en la figura 20. Se observa que todas muestran una disminución en los conteos normalizados en el control en comparación con el tratamiento de estrés, lo que corresponde con lo observado en la figura 19. La lista completa de genes diferencialmente expresados para el ddt 5 se encuentra en el anexo 2.

El gen TRINITY_GG_782_c10_g1_i51 corresponde al código PF08041, la cual corresponde a una familia de complejos proteicos que son una subunidad del citocromo b6f. Son altamente activos en la transferencia de electrones desde la 10-plastoquinona a la plastocianina oxidada (Pierre et al., 1995).

El gen TRINITY_GG_6751_c17_g1_i4 y el gen TRINITY_GG_6751_c17_g1_i10 corresponden al código PF00025, el cual es un factor de ribosilación ADP, que es parte de la familia de proteínas de unión a GTP (Boman & Kahn, 1995).

Por último, el gen TRINITY_GG_6269_c3_g1_i11 corresponde al código PF00036 que está anotado como Mano EF, que corresponde a una proteína de unión a calcio (Nakayama et al., 1992).

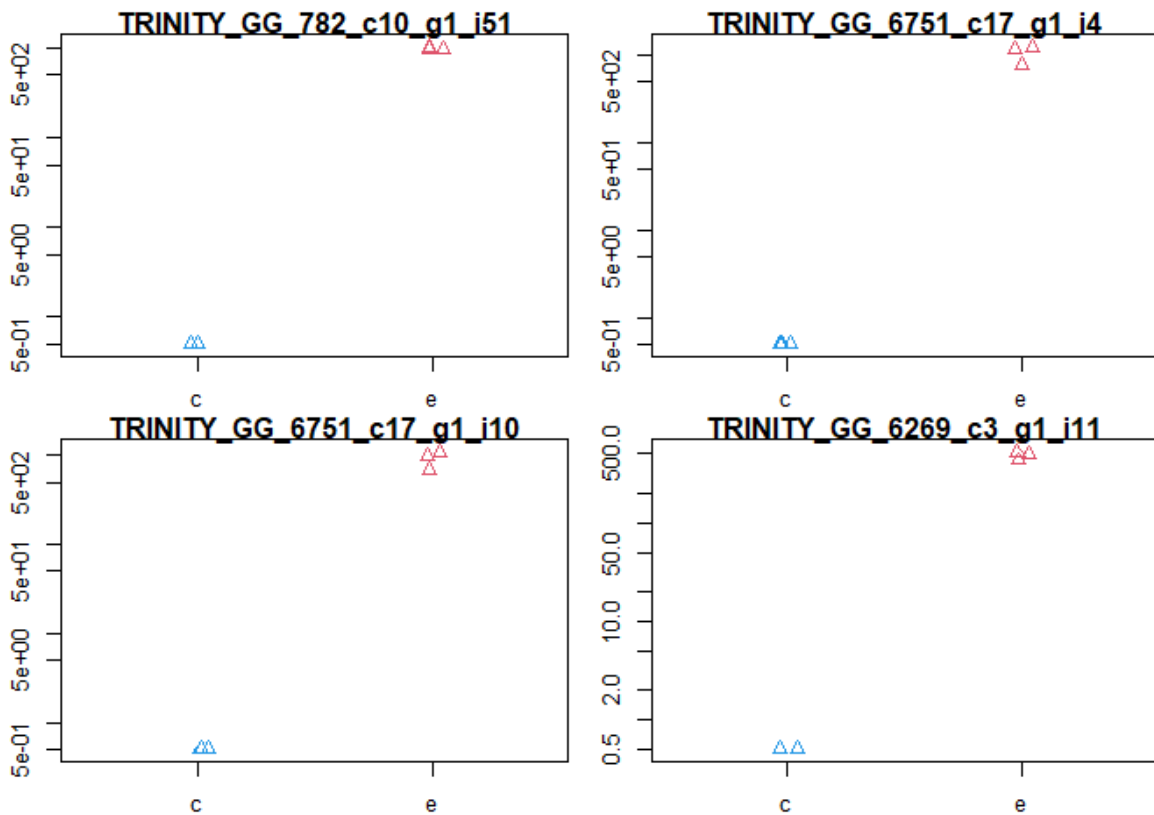


Figura 20. Comparación de conteos normalizados entre tratamientos (c =control y e= estrés) para el ddt 5, de los 4 genes con menor valor p.

Por otra parte, al comparar los tratamientos para el ddt 10 se encuentra que se tiene un total de 2931 genes diferencialmente expresados, 1662 con un log Fold change < - 1 y valor $p < 0,05$ y 1269 con un log Fold change >1 y valor $p < 0,05$. Esto se puede observar en la figura 21.

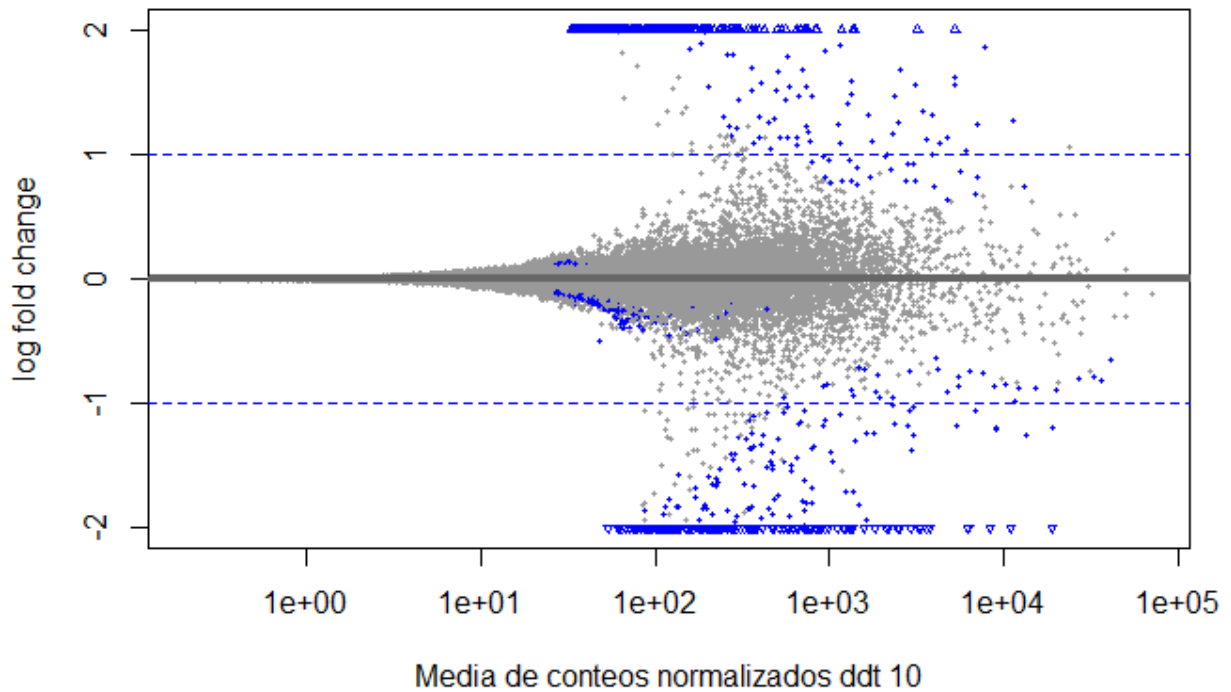


Figura 21. MAplot (Media de conteos normalizados entre tratamientos en el ddt 10 vs log Fold change)

Dentro de los genes diferencialmente expresados, los 4 con menor valor p fueron los que se encuentran en la figura 22. De igual manera que en el ddt 5, la mayoría muestran un incremento en los conteos normalizados para el estrés en comparación con el control.

El gen TRINITY_GG_777_c951_g1_i1 correspondiente al código PF00046 que anota un dominio estructural proteico conocido como Homeodominio de pliegue, comúnmente hallado en factores de transcripción (Gehring, 1992). Por su parte, el gen TRINITY_GG_1676_c22_g1_i4 correspondiente al código PF00967, dentro de la base de datos de PFAM (Mistry et al., 2021), anota al dominio proteico Barwin, que tiene como función la unión a sacáridos, proceso común en los mecanismos de defensa de las plantas (Svensson et al., 1992).

El gen TRINITY_GG_433_c1_g1_i5 corresponde al código PF08241, reportado como un dominio metil-transferasa dependiente de SAM, que está involucrado en el proceso de regulación génica (Zhang & Cheng, 2003). Por último, el gen TRINITY_GG_6738_c187_g1_i2 correspondiente al código PF00182, anota a una enzima con función quitinasa o hidrolasas, participes en los procesos de respuesta a ataque de insectos (Davies & Henrissat, 1995; Flach et al., 1992).

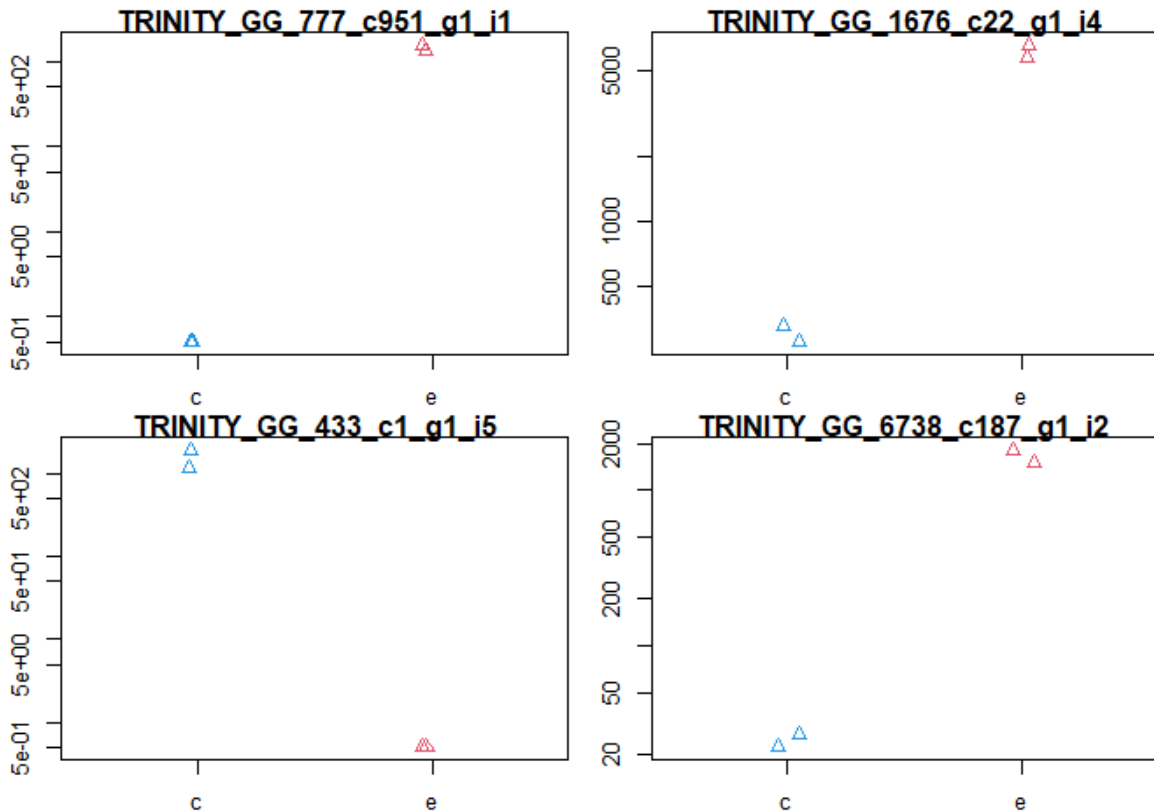


Figura 22. Comparación de conteos normalizados entre tratamientos (c =control y e= estrés) para el ddt 10, de los 4 genes con menor valor p.

Por otra parte, la figura 23 muestra la cantidad de genes diferencialmente expresados entre controles y tratamiento de estrés, compartidos entre el ddt 5 y ddt 10 y diferenciados por LFC.

Entre el ddt 5 y 10 con LFC >1 se comparten 20 genes, y aquellos con LFC <-1 190. Entre ddt 5 con LFC >1 y ddt 10 con LFC <-1 24. De ddt 5 con LFC <-1 y ddt 10 con LFC >1 79. La mayor cantidad de genes se encuentran en el ddt 5 con LFC <-1 que corresponde a genes regulados a la baja, y el menor corresponde al Pt ddt 5 ddt 10 con LFC >1, siendo términos regulado al alza.

Por otro lado, al comparar dentro del ddt 10, encontramos que hay una mayor cantidad de genes con LFC <-1, que corresponde a genes regulados a la baja, en comparación a aquellos con LFC > 1.

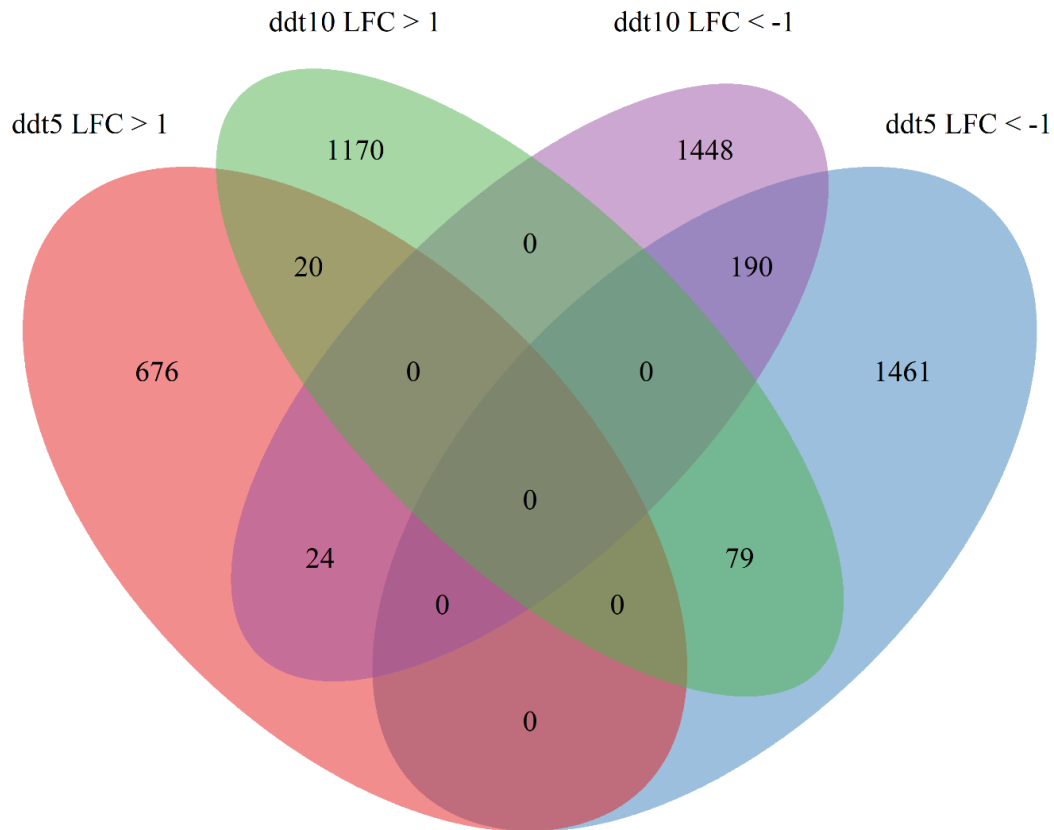


Figura 23. Diagrama de Venn comparando las listas de genes diferencialmente expresados (SDE) del ddt 5 y 10.

En la tabla 4 se observan los primeros cinco términos con mayor enriquecimiento según la lista de genes diferencialmente expresados para el ddt 5 para el tratamiento de estrés en relación con el control, que tienen LFC <-1 y valor p <0,05 (la lista completa se encuentra en el anexo 3). En estos términos se observa aquellos relacionados con proceso biológico, componente celular y función molecular. Al ser aquellos términos enriquecidos por los genes diferencialmente expresados con LFC <-1, son términos regulados a la baja o down-regulated.

Tabla 4. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en el ddt 5 para genes con LFC < -1

	Término de ontología génica	Valor p	Término GO
Proceso biológico	plant organ development	1.79E-19	GO:0099402
	root system development	1.32E-10	GO:0022622
	reproductive shoot system development	2.04E-09	GO:0090567
	plant epidermis development	5.79E-09	GO:0090558
	embryo development ending in seed dormancy	4.04E-08	GO:0009793

Componente celular	plasmodesma	7.02E-08	GO:0009506
	chloroplast stroma	1.48E-06	GO:0009570
	plant-type cell wall	1.53E-06	GO:0009505
	cellular bud	2.29E-05	GO:0005933
	plastid envelope	1.54E-04	GO:0009526
Función molecular	disulfide oxidoreductase activity	3.51E-05	GO:0015036
	NAD binding	4.62E-05	GO:0051287
	vitamin B6 binding	5.24E-05	GO:0070279
	transferase activity, transferring nitrogenous groups	2.47E-04	GO:0016769
	protein serine/threonine/tyrosine kinase activity	3.28E-04	GO:0004712

En la tabla 5 se observan los primeros cinco términos con mayor enriquecimiento según la lista de genes diferencialmente expresados para el ddt 5 que tienen LFC >1 y valor p <0,05. En estos términos se observa aquellos relacionados con proceso biológico, componente celular y función molecular. Estos términos enriquecidos por los genes diferencialmente expresados con LFC >1, son términos up-regulated o regulados al alta. A diferencia de la tabla 4, en la tabla 5 se observan términos de ontología génica relacionados con respuesta a estímulos externos.

Tabla 5. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en ddt 5 para genes con LFC > 1

	Término de ontología génica	Valor p	Término GO
Proceso biológico	plant organ development	1.87E-11	GO:0099402
	root system development	3.60E-08	GO:0022622
	mitotic cytokinesis	2.56E-07	GO:0000281
	response to water	3.42E-07	GO:0009415
	response to abscisic acid	8.32E-07	GO:0009737
Componente celular	cellular bud	6.97E-07	GO:0009506
	chloroplast stroma	1.91E-06	GO:0009570
	pericentric heterochromatin	0.0569	GO:0005721
	cis-Golgi network	1.59E-04	GO:0005801
	chloroplast thylakoid membrane	5.37E-04	GO:0009535
Función molecular	vitamin B6 binding	2.20E-05	GO:0070279
	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate binding	7.26E-05	GO:0005547

	ADP binding	9.72E-05	GO:0043531
	anion: anion antiporter activity	9.72E-05	GO:0015297
	alcohol dehydrogenase (NADP+) activity	2.85E-04	GO:0008106

En la tabla 6 se observan los primeros cinco términos con mayor enriquecimiento según la lista de genes diferencialmente expresados para el ddt 10 que tienen LFC < -1 y valor p < 0,05. Estos términos enriquecidos por los genes diferencialmente expresados con LFC < -1, es decir términos regulados a la baja o down-regulated.

Tabla 6. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en el ddt 10 con LFC < -1.

	Término de ontología génica	Valor p	Término GO
Proceso biológico	plant organ development	2.35E-17	GO:0099402
	reproductive shoot system development	6.23E-10	GO:0090567
	root system development	2.09E-09	GO:0022622
	embryo development ending in seed dormancy	1.60E-08	GO:0009793
	response to water	1.60E-08	GO:0009415
Componente celular	plasmodesma	1.18E-09	GO:0009506
	plant-type cell wall	4.31E-07	GO:0009505
	cellular bud	1.05E-05	GO:0005933
	lipid droplet	6.21E-05	GO:0005811
	protein phosphatase type 2A complex	2.12E-04	GO:0000159
Función molecular	transferase activity, transferring nitrogenous groups	8.42E-06	GO:0016769
	vitamin B6 binding	2.24E-05	GO:0070279
	p53 binding	4.83E-05	GO:0002039
	manganese ion binding	1.84E-04	GO:0030145
	histone deacetylase binding	2.67E-04	GO:0042826

En la tabla 7 se observan los primeros cinco términos con mayor enriquecimiento según la lista de genes diferencialmente expresados para el ddt 10 que tienen LFC > 1 y valor p < 0,05. En estos términos se observa aquellos relacionados con proceso biológico, componente celular y función molecular. Estos términos enriquecidos por los genes diferencialmente

expresados con LFC >1, son términos up-regulated o regulados al alta y en este caso se observa procesos relacionados con la respuesta a estrés principalmente.

Tabla 7. Términos enriquecidos según dcGO de GDE en el ddt 10 con LFC >1.

	Término de ontología génica	Valor p	Término GO
Proceso biológico	plant organ development	3.61E-13	GO:0099402
	root system development	1.59E-08	GO:0022622
	response to water	1.28E-07	GO:0009415
	embryo development ending in seed dormancy	1.28E-07	GO:0009793
	response to abscisic acid	3.79E-07	GO:0009737
Componente celular	chloroplast stroma	1.59E-07	GO:0009570
	plasmodesma	3.45E-06	GO:0009506
	eukaryotic translation initiation factor 4F complex	8.38E-05	GO:0016281
	cellular bud	1.04E-04	GO:0005933
	thylakoid	1.70E-04	GO:0009579
Función molecular	vitamin B6 binding	9.87E-05	GO:0070279
	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water	1.53E-04	GO:0016717
	ADP binding	2.94E-04	GO:0043531
	nucleosome binding	2.94E-04	GO:0031491
	solute:proton symporter activity	6.99E-04	GO:0015295

Respecto a las categorías de Proceso biológico (PB), Componente celular (CC) y Función molecular (FM), estas tuvieron enriquecimiento diferencial, como se observa en la tabla 8. La categoría con mayor número de término es la de Proceso biológico, seguida por Componente celular y finalmente por Función molecular. Para el ddt 5 con LFC > 1 se encontró una mayor cantidad de categorías, y siendo el ddt 5 con LFC < -1 la que tiene menor cantidad. Pese a esto, para el ddt 10 se observa un aumento en las categorías para los genes con LFC < -1 y una disminución para aquellos con LFC >1.

Tabla 8. Cantidad de categorías enriquecidas según dcGO para cada punto de muestreo (ddt). Proceso biológico (PB), Componente celular (CC) y Función molecular (FM)

	Ddt 5 LFC < -1	Ddt 5 LFC > 1	Ddt 10 LFC < -1	Ddt 10 LFC > 1
BP	265	379	326	288

CC	25	55	44	34
FM	23	40	22	32

Discusión

Se analizaron los cambios en los niveles de expresión de mRNA maduro entre plantas de gulupa sometidas a déficit hídrico y plantas mantenidas en condiciones control sin déficit hídrico. En términos generales se observó que hay claras diferencias en la expresión entre los tratamientos establecidos y estos cambios se hacen notorios con el tiempo (Fig. 19 y Fig. 21). En el capítulo 1 se observó las tendencias en distintas variables fisiológicas y se encontró que bajo las condiciones de déficit hídrico las plantas de gulupa actúan cerrando las estomas, pero en las demás variables los cambios no fueron significativamente diferentes en los puntos de muestreo del experimento.

Anteriormente se encontró que, en un tiempo mayor de exposición al déficit hídrico, *P. edulis* Sims f. *edulis* tiene una reducción en el crecimiento, la cual se ve acompañada de una disminución en el Contenido relativo de Agua (CRA) desde el día 39 de déficit. Estos cambios en el crecimiento se vieron principalmente en la zona aérea de la planta, reflejados en Área foliar y altura, puesto que se encontró que la zona radicular presentaba un aumento en la masa seca en plantas bajo déficit hídrico en comparación con el control (Lozano-Montaña et al., 2021)

En el ddt 5, se observan cambios en la expresión entre el control y tratamiento de estrés, en donde encontramos una mayor cantidad de genes con regulación a la baja en comparación a aquellas con regulación al alta, 1730 y 720, respectivamente (Fig. 19). Este comportamiento se mantiene para el ddt 10, donde se encuentra de nuevo mayor cantidad de genes reguladas a la baja en comparación a aquellas reguladas al alta, 1662 y 1269, respectivamente; aunque la diferencia se hace menos notoria entre una y otra.

Las bajas en la expresión de genes se han observado en otros estudios, como en el de (Zhang et al., 2018) donde se encontró que en plantas de maíz sometidas a déficit hídrico la mayoría de los genes diferencialmente expresados estaban siendo regulados a la baja, lo que implicaría una tendencia a la inhibición de la expresión génica global resultado del estado de estrés.

Para ddt 5, se observaron cambios en la expresión diferencial del 3,4% de genes analizados, cuya mayoría estaban siendo reguladas a la baja. Se escogieron 4 genes que tuvieran el menor valor p , cuyos conteos se vieron aumentados en el tratamiento de estrés respecto al control (Figura 20). Se encontró que el primer gen corresponde una familia de complejos proteicos, la subunidad del citocromo $b6f$ (Pierre et al., 1995). El citocromo $b6f$ es uno de los complejos supramoleculares involucrados en la fotosíntesis y es el mediador en el transporte de electrones entre el Fotosistema II y el Fotosistema I, al transferir electrones luego de la fotólisis del agua hasta el $NADP^+$ (Dubey et al., 2022).

En un estudio realizado sobre plantas de sandía se encontró una reducción del 50% del complejo de citocromo $b6f$. Se sugirió que se debe al proceso de aclimatación de la planta al estrés, que empieza por el cierre estomático y supresión de la asimilación de CO_2 , lo que lleva a la disminución de la posibilidad de utilizar ATP y NADPH (Kohzuma et al., 2009).

Sin embargo, lo que se tiene para gulupa es un aumento de la expresión del citocromo $b6f$ a los 5 ddt. La respuesta temprana al estrés por déficit hídrico en gulupa probablemente va en búsqueda de aumentar la posibilidad de ingreso de protones (hidrogeniones H^+) provenientes de las plastoquinonas reducidas que pasan a través del citocromo $b6f$ al lumen del tilacoide para la fuerza motora protónica, así como la participación en la tasa de transferencia de electrones ETR para formar a través del proceso ATP y NADPH que serán necesarios en el ciclo de Calvin. Adicionalmente, es probable que las plantas de gulupa durante los primeros días de déficit hídrico (5 ddt) no se encuentren aun en situación de estrés agudo, aunque presentan cierre estomático como mecanismo de evitación del estrés y conservación del agua, manteniendo el flujo energético del PSII, la fuerza motora

protónica y la tasa de transferencia de electrones, lo que podría explicar la ausencia de cambios en la fluorescencia de la clorofila a y por tanto una buena eficiencia a nivel del PSII y de la fotoquímica del proceso.

Al realizar la búsqueda de este término (citocromo b6f) para el ddt 10, no se encontró dentro de la lista de genes diferencialmente expresados, pero el código PFAM sí. Este término está dentro de aquellos regulados a la baja, lo que contribuiría a lo reportado por Kohzuma et al., (2009) para sandía y lo encontrado en los valores de PI_{ABS} en las plantas de nuestro experimento (capítulo anterior), donde la disminución se daría como resultado de la búsqueda de prevenir la transferencia de electrones excesiva y proteger a la célula de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Takizawa et al., 2008).

El segundo y tercer gen con menor valor p para el ddt 5 anotan al código PF00025 que corresponde al factor de ribosilación ADP de proteínas de unión GTP (Boman & Kahn, 1995). Esta familia de proteínas cumple con la función de transporte de vesículas desde el retículo endoplasmático (Spang et al., 2010), se ha reportado su función crítica en el desarrollo vegetal (Naramoto et al., 2010; Xu & Scheres, 2005). Aparte se ha reportado un papel en la respuesta a estrés abiótico permitiendo la producción de mensajeros secundarios, e incluso mostrando que su expresión ectópica conlleva a un aumento en la tolerancia a estrés salino e hídrico en *A. thaliana* (Joshi et al., 2014). Lo que concuerda a lo reportado por (D. Chen et al., 2021), en donde proteínas de esta familia regulan positivamente la señalización mediada por ABA, que cumple un papel fundamental en la respuesta al estrés por déficit hídrico.

El cuarto gen con menor valor p en el ddt 5 corresponde a un motivo proteico que hace parte de proteínas de unión al calcio, la mano EF (Nakayama et al., 1992). En plantas el calcio es un mensajero secundario relacionado con cascadas de señalización, mediando señales hormonales y ambientales, y teniendo una participación en la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Reddy, 2001). El dominio de mano EF está presente en distintos tipos de proteínas, incluidos factores de elongación, proteínas de unión a DNA, a proteína o a ATP/GTP, entre muchas otras, lo que indica de la gran variedad de vías que media el calcio dentro de la célula vegetal (Day et al., 2002).

En estudios más recientes se ha sugerido el posible papel de estos dominios en la respuesta a estreses ambientales, encontrando cambios en la expresión de un gran porcentaje de genes relacionados a la mano EF en tratamientos de múltiples estreses; incluyendo al estrés por déficit hídrico. A su vez se ha observado su influencia en los niveles de tolerancia y

susceptibilidad de especies como tabaco, soya y *A. thaliana*, al probar la inserción de mutaciones en las secuencias o knock-outs (Zeng et al., 2017).

Los cambios en la expresión para las plantas de gulupa de tratamiento de estrés a los 5 ddt denotan también una relación con los eventos de cascadas de señalización, y es que bajo condiciones de déficit hídrico las plantas censan y producen señales de estrés que derivan directa o indirectamente en la activación o inhibición de mecanismos de respuesta, que conllevan a cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (Yang et al., 2021).

En el ddt 10 el gen con menor valor p y aumento en los conteos normalizados (Figura 22), corresponde a un homeodominio de pliegue común en factores de transcripción relacionados con procesos de desarrollo (Gehring, 1992). Aunque no se especifica en qué factores de transcripción está presente este dominio, es de común interés estudiar los cambios en la expresión de los factores de transcripción en respuesta a estrés, dado que representan a los interruptores moleculares en la regulación de la respuesta al estrés (Joshi et al., 2016).

Por su parte, el aumento en la expresión del segundo gen, que anota al dominio proteínico Barwin (Svensson et al., 1992), se ha reportado como respuesta común en los mecanismos de defensa en plantas, principalmente en el mecanismo relacionado a patogénesis. Wang et al., (2011) reportaron el aumento en la expresión de genes relacionados con este dominio en plantas de arroz en respuesta a distintos estreses, dentro de los que se encuentra el déficit hídrico, participando en la señalización por ABA y mostrando aumento de la tolerancia en plantas con sobreexpresión de estos genes.

El tercer gen con menor valor p del ddt 10 es el único que muestra bajas en los conteos en el tratamiento. Este está anotado a un dominio metiltransferasa dependiente de la S-Adenosil Metionina SAM, co-sustrato que interviene en la transferencia de grupos metilo desde la SAM a sustratos como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Las metiltransferasa en general corresponden aproximadamente al 1,5% de los genes codificantes de proteínas (Katz et al., 2003), y aquellas que son dependientes de SAM se han reportado como reguladores de las dinámicas celulares de señalización e importantes para el mantenimiento de la homeostasis en respuesta a las condiciones cambiantes (Lissina et al., 2011).

En plantas de café se identificó un aumento en la expresión de genes relacionados a estos dominios en respuesta al déficit hídrico (Mofatto et al., 2016). En nuestro caso se observa lo contrario; se presentan bajas en la expresión por lo que para determinar qué función

cumple este gen se debe mirar más a fondo a qué proteína o sustrato específico corresponde, pues el dominio y la familia a la que corresponde tiene varias funciones (Stamm et al., 2014).

El cuarto gen analizado (10 ddt) corresponde a una enzima quitinasa (Davies & Henrissat, 1995). En general se reporta que esta familia tiene un papel clave en atribuir resistencia a estreses ambientales, así como ataques de insectos y de hongos patógenos. Para *Populus candensis* se encuentra incremento en la expresión de genes relacionados a esta familia de enzimas en respuesta a estrés hídrico (Jiang et al., 2013), similar a lo observado en nuestro experimento para gulupa; así como para otras especies (Cao et al., 2019).

Ahora analizando de una manera global los cambios en la expresión génica en las plantas de gulupa control y estrés, y al observar la tabla 4, encontramos que los procesos biológicos que se enriquecen en el ddt 5 con los genes con regulación a la baja están relacionados con crecimiento y desarrollo, lo que no cambia mucho en la tabla 6 de los genes regulados a la baja en el ddt 10. You et al., (2019) encontraron algo similar en plantas de una variedad susceptible de sésamo bajo tratamiento de déficit hídrico, donde los términos relacionados a crecimiento se enriquecían por lo genes regulados a la baja, lo que se reflejaba en una reducción del crecimiento.

Respecto al componente celular, que se refiere a la ubicación relativa o complejo macromolecular dentro de la célula donde un gen está ejecutando su función (Fang & Gough, 2013b). En las tablas 4 y 6 observamos términos similares en lo relacionado a la parte exterior de la célula y relacionado con la señalización (Zolnierowicz, 2000), lo que puede relacionarse con el hecho de que la mayor cantidad de genes son regulados a la baja y se presentan procesos disminuidos, como es el crecimiento.

Finalmente, respecto a lo regulado a la baja en cuanto a función molecular, se observan términos repetidos en las tablas 4 y 6, como es la Vitamina B6 y funciones similares respecto a actividad catalítica de diferentes tipos de enzimas. Estos dos términos al participar en los procesos metabólicos, específicamente en lo involucrado a la función catalítica en diferentes reacciones, se pueden ver inhibidos en procesos de respuesta a estrés, como son los procesos relacionados con el mantenimiento del metabolismo basal de la célula (Mangena, 2019).

Por otro lado, al analizar aquellos términos enriquecidos con los genes regulados al alta. Se encontró, en lo relacionado a proceso biológico (Tablas 5 y 7) que se encuentran términos relacionados a respuesta al agua y al ácido abscísico; así como a crecimiento. Los procesos

de respuesta a agua y al ácido abscísico están directamente relacionados a la presencia de déficit hídrico. Como ya se mencionó el ABA es quizás la hormona más importante en la regulación de los mecanismos de respuesta a estrés por déficit hídrico (Yang et al., 2021).

Respecto al crecimiento se observan que los términos se relacionan con la dormancia de semillas y la zona radicular, que a su vez se encuentran mediados por ABA (Ali et al., 2020). El crecimiento radicular se ha observado inducido en varias especies en respuesta a déficit hídrico, otorgándole a la planta una capacidad de adaptación a la escasez de agua (Dalal et al., 2018; Gupta et al., 2020; Kim et al., 2020; Zhao et al., 2019); que para el caso de las plantas de gulupa se encontró un aumento en la masa radicular en respuesta a déficit hídrico severo y moderado (Lozano-Montaña et al., 2021)

La dormancia de semillas es mediada por ABA, por lo que al haber un aumento de ABA en respuesta a estrés en este tipo de procesos se verán enriquecidos (Koramutla et al., 2021). Eso tendrá consecuencias a su vez en el efecto parental que va a causar el estrés (Vancostenoble et al., 2022) y también hace parte de los mecanismos de resistencia dentro de las plantas a la escasez de agua (Vicente et al., 2020).

Respecto a los términos que se encuentran en el Componente celular de los genes diferencialmente expresados y regulados al alta, para el ddt 10 se ha reportado que dentro de estructuras como la protuberancia celular o “Cellular bud” se generan cambios moleculares y bioquímicos en respuesta al déficit hídrico, asociado a tolerancia y recuperación (F. A. Hoekstra et al., 2001). Incluso se reporta que la capacidad de perder agua localizada en este tipo de tejidos o estructuras es una de las claves para la resistencia a las condiciones ambientales cambiantes (Pnueli et al., 2002). Este término se repite en la tabla 7, manteniéndose activados los mecanismos moleculares asociados a esta estructura.

También se encuentra términos relacionados con el cloroplasto, tanto de la membrana tilacoidal como del estroma. Lo que comprende tanto la transducción de energía (a través de los complejos proteínicos en la membrana tilacoidal) como aquella donde se da fijación y reducción del carbono a través del ciclo de Calvin en el estroma del cloroplasto y donde se generan los productos resultantes de este proceso. Así como demás componentes celulares del cloroplasto (Fang & Gough, 2013b). Estos términos se repiten en la tabla 7.

Se reporta que el cloroplasto es el primer organelo de las células del mesófilo en verse afectadas por el déficit hídrico (Noodén, 2004), y es de vital importancia, no solo por su intervención en el proceso fotosintético, sino también por su participación en procesos

metabólicos primarios, por lo que mantener su funcionamiento en condiciones de estrés es esencial para la planta (Razi & Muneer, 2021).

Esto también se puede relacionar con el mantenimiento de las variables asociadas a la fluorescencia de la clorofila, que no cambian en relación con el control; así como al mantenimiento del contenido de fotopigmentos en las plantas sometidas a déficit, hablando de la capacidad de tolerancia de las plantas de gulupa frente al estrés por déficit hídrico.

Por otro parte, también se encuentran términos relacionados con los plasmodesmos, la zona de comunicación intercelular, y la red Cis-Golgi involucrada en el transporte vesicular (Fang & Gough, 2013b). Esto se puede agrupar si hablamos de los procesos de comunicación celular presentes y de gran importancia en la respuesta a estrés; donde se pueden ver involucradas moléculas señal como proteínas, aminoácidos, hormonas, entre otras (Yang et al., 2021).

En respuesta a estrés los cambios en las moléculas de señalización han sido muy estudiados. Dentro de estas está la participación de ABA, que media procesos intra e intercelulares que llevan al aumento de la tolerancia a eventos de estrés (Cardoso et al., 2020). Por otra parte, las ROS son utilizadas como señalizadoras, al presentarse un aumento en su concentración como consecuencia del desbalance energético de la célula; estas moléculas modifican la estructura y funcionamiento de distintas proteínas, llevando a cambios fisiológicos relevantes, como es la tasa de conductancia estomática (Qi et al., 2018). Cambios en gs se observaron en las plantas de gulupa desde los 5 ddt con déficit hídrico y se presentó una reducción progresiva en sus valores durante el experimento.

A su vez, esas moléculas señalizadoras y en general los procesos de señalización dentro de la planta, sugieren beneficios en la tasa de respuesta y supervivencia ante las condiciones cambiantes y permiten el mantenimiento de la homeostasis celular que protege los distintos componentes y procesos celulares (Hussain et al., 2019).

Adicionalmente, en lo que respecta al componente celular, observamos dos términos en las tablas 5 y 7, Heterocromática peri céntrica y Complejo de iniciación de la traducción eucariótica -Factor 4F, los cuales se reportan relacionados directa o indirectamente con cambios en la expresión génica, que a su vez se ve modificada por la presencia de estreses como el déficit hídrico (Yang et al., 2021). En plantas de arroz se observó cambios en las conformaciones de la cromatina en respuesta a estrés salino e hídrico, principalmente llevando a conformación de heterocromatina. Se cree que está directamente relacionado

con afectaciones en la tasa de crecimiento de la planta (Polosoro et al., 2019). Cambios en la dinámica de crecimiento, que se observaron en plantas de gulupa sometidas a déficit hídrico en un experimento anterior (Lozano-Montaña et al., 2021).

En plantas de soya se encontró que cambios inducidos por la desecación en complejos de inicio de la traducción mejoraban la respuesta de las plantas frente al estrés, permitiéndole ser más tolerantes (Gallino et al., 2018). Debido a su participación en los pasos de iniciación de la síntesis de distintas proteínas (Browning & Bailey-Serres, 2015) y a que en diversos estudios de mutantes de *A. thaliana* se ha evidenciado su importancia en la respuesta a estrés al observar cambios en el crecimiento y en el contenido de fotopigmentos ciclo de xantofilas (Chen, 2020). La regulación de la traducción es esencial frente la respuesta a estrés. Frente a déficit hidro, al igual que la transcripción, se presenta una reducción en la tasa de estos procesos de manera global, los cambios a su vez se enfocan en los distintos mecanismos de respuesta presentes en las plantas, que puede llevar a tener variedades más o menos tolerantes (Gallie, 2016).

Respecto a la función molecular enriquecida por los genes regulados al alta, se encuentra el termino Unión a Vitamina B6, tanto en la tabla 5 como 7. Se encontró enriquecimiento de términos relacionados con la Vitamina B6 en plantas de maíz expuestas a estrés por frío, sugiriendo su función en la resistencia de maíz a este estrés (Meng et al., 2022). La vitamina B6 se reporta como esencial para muchos procesos bioquímicos principalmente relacionados con la síntesis de aminoácidos (Drewke & Leistner, 2001); a su vez se reporta su función como cofactor y como antioxidante, mejorando la respuesta frente a estreses bióticos y abióticos (Huang et al., 2013). Para gulupa observamos su presencia en el ddt 5 y 10, asociándose su participación en los mecanismos de tolerancia de las plantas frente al déficit hídrico.

Por otra parte, se observan términos asociados a la unión específica de distintas moléculas con otras moléculas. Este resultado concuerda con lo encontrado en otros estudios donde se reporta la actividad constante de estos procesos a nivel de transcriptoma (Lu et al., 2010). Dentro de los términos de unión a proteína y nucleótidos se observa la importancia de la regulación de la transcripción y traducción en la respuesta a déficit hídrico.

A su vez aquellos términos asociados a actividad oxidorreductasa, puede tener función antioxidante, y a su vez sugiere la generación de especies reactivas de oxígeno, el control y el desencadenamiento del sistema de señalización mediada por ROS (Tang et al., 2013). Esto concuerda con los demás términos que se han encontrado asociados al sistema antioxidante, así como el mantenimiento del contenido de foto pigmentos descrito en el capítulo anterior.

Conclusiones

Con el análisis actual, encontramos que las plantas de gulupa activan distintos mecanismos al momento de verse enfrentadas a déficit hídrico. Estos mecanismos les permiten responder de tal manera frente al estrés que las variables fisiológicas no se ven disturbadas, al menos dentro de los primeros 15 días. Estos caminos de respuesta le otorgan a la planta cierta tolerancia a la escasez de agua, y a su vez lleva a evitar la pérdida de agua dentro del tejido celular.

Dentro de los mecanismos de respuesta activados es importante resaltar aquellos relacionados con el mantenimiento REDOX y la activación de procesos de transcripción y traducción, lo que le permite a la planta suplir la necesidad de distintos procesos metabólicos y evitar un desbalance energético.

Por otro lado, se observa los cambios tempranos en aquellos términos relacionados con crecimiento, en distintos tejidos, que al paso del tiempo llevarán a la disminución en el crecimiento de la planta, siendo este el proceso sacrificado para poder responder al estrés.

Es importante realizar un análisis más profundo del transcriptoma, pues la información es amplia y se pueden encontrar aún más cosas relacionadas a la respuesta a estrés por déficit hídrico. A su vez, se debe indagar sobre genes específicos involucrados en la respuesta, que tengan un papel central en la regulación de la transcripción diferencial.

Anexos

Anexo 1. Resumen librerías

ID Muestra	Pares de bases totals (bp)	Lecturas totales	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
P1C1	3,030,043,026	30,000,426	46.05	53.95	97.96	94.18
P1C2	3,151,754,288	31,205,488	46.07	53.93	97.89	94.1
P1C3	3,261,790,152	32,294,952	46.03	53.97	98.06	94.46
P2C1	3,417,066,138	33,832,338	47.0	53.0	98.05	94.45
P2C2	4,091,825,726	40,513,126	46.98	53.02	98.16	94.81
P2C3	3,246,149,696	32,140,096	45.61	54.39	98.13	94.61
P2E1	4,079,980,648	40,395,848	46.05	53.95	98.16	94.99
P2E2	5,011,087,932	49,614,732	47.59	52.41	97.93	94.36
P2E3	5,001,540,604	49,520,204	47.24	52.76	97.94	94.42
P3C1	3,150,406,140	31,192,140	46.11	53.89	98.02	94.34
P3C2	4,516,822,414	44,721,014	48.68	51.32	98.34	95.21
P3C3	4,113,795,852	40,730,652	46.26	53.74	98.36	95.13
P3E1	3,262,725,412	32,304,212	46.14	53.86	98.05	94.41
P3E2	4,355,938,908	43,128,108	45.64	54.36	98.38	95.23
P3E3	4,430,338,740	43,864,740	46.5	53.5	98.27	95.01

Anexo 2. Lista de genes diferencialmente expresados para el ddt 5 y 10, respectivamente.

https://docs.google.com/spreadsheets/u/1/d/1QxsRopiFLA5c7rDRhrKbJOZYIzglf5nn/edit?usp=drive_web&oid=102257974123800132535&rtpof=true

https://docs.google.com/spreadsheets/u/1/d/1NoriRf6Wn5h5D_EFvonL37dm_pg8mZZz/edit?usp=drive_web&oid=102257974123800132535&rtpof=true

Anexo 3. Tabla de enriquecimiento para el ddt 5 con LFC >1 y >-1, y para el ddt 10, respectivamente.

https://docs.google.com/spreadsheets/u/1/d/10pj_4HPtEd2o_VQ610T_Usj3XQbwBi1Z/edit?usp=drive_web&oid=102257974123800132535&rtpof=true

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1hVp2ME_PeSJhWne4_KybIFSov_8sF18r/edit#gid=1840437085

https://docs.google.com/spreadsheets/u/1/d/1_np4328MCba8Fc-Rj5xQT6pvaohl2WAE/edit?usp=drive_web&oid=102257974123800132535&rtpof=true

https://docs.google.com/spreadsheets/u/1/d/1q04V7wMUPoqNvBCT9MtHNDzH5MWWgKBs/edit?usp=drive_web&oid=102257974123800132535&rtpof=true

Bibliografía

- Ahmad, Z., Anjum, S., Waraich, E. A., Ayub, M. A., Ahmad, T., Tariq, R. M. S., Ahmad, R., & Iqbal, M. A. (2018). Growth, physiology, and biochemical activities of plant responses with foliar potassium application under drought stress – a review. *Https://Doi.Org/10.1080/01904167.2018.1459688*, 41(13), 1734–1743.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1459688>
- Alam Khan, M., Iqbal, M., Jameel, M., Nazeer, W., Shakir, S., Aslam, M. T., & Iqbal, B. (2013). Potentials of molecular based breeding to enhance drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10(55), 11340–11344.
<https://doi.org/10.4314/ajb.v10i55>.
- Alborzi, S. Z., Devignes, M. D., & Ritchie, D. W. (2017). Associating gene ontology terms with pfam protein domains. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 10209 LNCS, 127–138.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-56154-7_13/TABLES/2
- Ali, S., Hayat, K., Iqbal, A., & Xie, L. (2020). Implications of Abscisic Acid in the Drought Stress Tolerance of Plants. *Agronomy 2020*, Vol. 10, Page 1323, 10(9), 1323.
<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10091323>
- Amrhein, N., Apel, K., Baginsky, S., Buchmann, N., Geisler, M., Keller, F., Körner, C., Martinoia, E., Merbold, L., Müller, C., Paschke, M., & Schmid, B. (2013). *Plant response to stress*.
<https://doi.org/10.3929/ETHZ-A-009779047>

- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 2010 11:10, 11(10), 1–12. <https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-10-R106>
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Zohaib, A., Tanveer, M., Naeem, M., Ali, I., Tabassum, T., & Nazir, U. (2017). Growth and developmental responses of crop plants under drought stress: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104(3), 267–276. <https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.034>
- Anjum, S. A., Wang, L. C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. L., & Zou, C. M. (2011). Brassinolide Application Improves the Drought Tolerance in Maize Through Modulation of Enzymatic Antioxidants and Leaf Gas Exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(3), 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00459.x>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.55.031903.141701>
- Arslan, Balkan Nalçaiyi, A. S., Çulha Erdal, Pekcan, V., Kaya, Y., Çiçek, N., & Ekmekçi, Y. (2020). Special issue in honour of Prof. Reto J. Strasser – Analysis of drought response of sunflower inbred lines by chlorophyll a fluorescence induction kinetics. <Http://Ps.Ueb.Cas.Cz/Doi/10.32615/Ps.2019.171.Html>, 58(SPECIAL ISSUE), 348–357. <https://doi.org/10.32615/PS.2019.171>
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2005.12.006>
- ASOHOFrucol. (2020). *Cartilla Producción Hortofrutícola* . <https://www.asohofrucol.com.co/biblioteca?paginalib=2#libros>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.59.032607.092759>
- Banks, J. M. (2017). Continuous excitation chlorophyll fluorescence parameters: a review for practitioners. *Tree Physiology*, 37(8), 1128–1136. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/TPX059>
- Bano, H., Athar, H. ur R., Zafar, Z. U., Kalaji, H. M., & Ashraf, M. (2021). Linking changes in chlorophyll a fluorescence with drought stress susceptibility in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1244–1254. <https://doi.org/10.1111/PPL.13327>
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses* 2014, Vol. 6, Pages 106-136, 6(1), 106–136. <https://doi.org/10.3390/V6010106>
- Basu, S., & Rabara, R. (2017). Abscisic acid — An enigma in the abiotic stress tolerance of crop plants. *Plant Gene*, 11, 90–98. <https://doi.org/10.1016/J.PLGENE.2017.04.008>

- Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, *132*(1), 21–32.
<https://doi.org/10.1111/PBR.12004>
- Bodner, G., Nakhforoosh, A., & Kaul, H. P. (2015). Management of crop water under drought: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, *35*(2), 401–442.
<https://doi.org/10.1007/S13593-015-0283-4/FIGURES/5>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Boman, A. L., & Kahn, R. A. (1995). Arf proteins: the membrane traffic police? *Trends in Biochemical Sciences*, *20*(4), 147–150. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)88991-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)88991-4)
- Browning, K. S., & Bailey-Serres, J. (2015). Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *13*, e0176.
<https://doi.org/10.1199/TAB.0176>
- Caballero, M., Lozano, S., & Ortega, B. (2007). *Efecto invernadero, cambio climático, calentamiento global*. (Vol. 8). Revista Digital Universitaria.
- Cai, W., Zhang, C., Suen, H. P., Ai, S., Bai, Y., Bao, J., Chen, B., Cheng, L., Cui, X., Dai, H., Di, Q., Dong, W., Dou, D., Fan, W., Fan, X., Gao, T., Geng, Y., Guan, D., Guo, Y., ... Gong, P. (2021). The 2020 China report of the Lancet Countdown on health and climate change. *The Lancet Public Health*, *6*(1), e64–e81. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(20\)30256-5](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(20)30256-5)
- Cao, S., Wang, Y., Li, Z., Shi, W., Gao, F., Zhou, Y., Zhang, G., & Feng, J. (2019). Genome-Wide Identification and Expression Analyses of the Chitinases under Cold and Osmotic Stress in *Ammopiptanthus nanus*. *Genes* 2019, Vol. 10, Page 472, *10*(6), 472.
<https://doi.org/10.3390/GENES10060472>
- Cardoso, A. A., Gori, A., Da-Silva, C. J., & Brunetti, C. (2020). Abscisic Acid Biosynthesis and Signaling in Plants: Key Targets to Improve Water Use Efficiency and Drought Tolerance. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, Page 6322, *10*(18), 6322.
<https://doi.org/10.3390/APP10186322>
- Carr, M. K. V. (2013). The water relations and irrigation requirements of passion fruit (*passiflora edulis sims*): A review. In *Experimental Agriculture* (Vol. 49, Issue 4, pp. 585–596).
<https://doi.org/10.1017/S0014479713000240>
- Castillo, N. C. R., Wu, X., Chacón, M. I., Melgarejo, L. M., & Blair, M. W. (2021). Genetic Diversity of Purple Passion Fruit, *Passiflora edulis f. edulis*, Based on Single-Nucleotide Polymorphism Markers Discovered through Genotyping by Sequencing. *Diversity* 2021, Vol. 13, Page 144, *13*(4), 144. <https://doi.org/10.3390/D13040144>
- Caturegli, L., Matteoli, S., Gaetani, M., Grossi, N., Magni, S., Minelli, A., Corsini, G., Remorini, D., & Volterrani, M. (2020). Effects of water stress on spectral reflectance of bermudagrass. *Scientific Reports* 2020 *10*:1, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72006-6>

- Chen, D., He, L., Lin, M., Jing, Y., Liang, C., Liu, H., Gao, J., Zhang, W., & Wang, M. (2021). A ras-related small GTP-binding protein, RabE1c, regulates stomatal movements and drought stress responses by mediating the interaction with ABA receptors. *Plant Science*, *306*, 110858. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2021.110858>
- Chen, P., Ran, S., Li, R., Huang, Z., Qian, J., Yu, M., & Zhou, R. (2014). Transcriptome de novo assembly and differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Molecular Breeding*, *34*(4), 1879–1891. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0146-8>
- Chen, Y.-C. (2020). Introductory Chapter: Gene Expression and Phenotypic Traits. *Gene Expression and Phenotypic Traits*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.89863>
- Chuvienco-Salinerio, E. (2010). *Teledetección ambiental : la observación de la tierra desde el espacio* (Ariel, Ed.; 1st ed.). https://bibliotecadigital.uchile.cl/discovery/fulldisplay?vid=56UDC_INST:56UDC_INST&search_scope=MyInst_and_CI&tab=Everything&docid=alma991001205769703936&lang=es&context=L&adaptor=Local%20Search%20Engine&query=any,contains,the%20new%20nature%20of%20maps&facet=library,include,56UDC_INSTAQ06&offset=0
- Çiçek, N., Pekcan, V., Arslan, Ö., Çulha Erdal, Ş., Balkan Nalçaiyi, A. S., Çil, A. N., Şahin, V., Kaya, Y., & Ekmekçi, Y. (2019). Assessing drought tolerance in field-grown sunflower hybrids by chlorophyll fluorescence kinetics. *Revista Brasileira de Botanica*, *42*(2), 249–260. <https://doi.org/10.1007/S40415-019-00534-1/FIGURES/5>
- Comstock, J. P. (2002). Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, *53*(367), 195–200. <https://doi.org/10.1093/JEXBOT/53.367.195>
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczeniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* *2016 17:1*, *17*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S13059-016-0881-8>
- Dalal, M., Sahu, S., Tiwari, S., Rao, A. R., & Gaikwad, K. (2018). Transcriptome analysis reveals interplay between hormones, ROS metabolism and cell wall biosynthesis for drought-induced root growth in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, *130*, 482–492. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.07.035>
- Datt, B. (1999). A New Reflectance Index for Remote Sensing of Chlorophyll Content in Higher Plants: Tests using Eucalyptus Leaves. *Journal of Plant Physiology*, *154*(1), 30–36. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80314-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80314-9)
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure (London, England : 1993)*, *3*(9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)

- Day, I. S., Reddy, V. S., Shad Ali, G., & Reddy, A. (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis. *Genome Biology* 2002 3:10, 3(10), 1–24. <https://doi.org/10.1186/GB-2002-3-10-RESEARCH0056>
- de Brito, G. G., Sofiatti, V., de Andrade Lima, M. M., de Carvalho, L. P., & Filho, J. L. da S. (2011). Traços fisiológicos para fenotipagem de algodoeiro sob seca. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 33(1), 117–125. <https://doi.org/10.4025/ACTASCIAGRON.V33I1.9839>
- Drewke, C., & Leistner, E. (2001). Biosynthesis of vitamin B6 and structurally related derivatives. *Vitamins and Hormones*, 61, 121–155. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(01\)61004-5](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(01)61004-5)
- Dubey, A. K., Kumar, N., & Sanyal, I. (2022). Targets of NO in plastids. *Nitric Oxide in Plant Biology: An Ancient Molecule with Emerging Roles*, 331–344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00032-7>
- Dubois, M., & Inzé, D. (2020). Plant growth under suboptimal water conditions: early responses and methods to study them. *Journal of Experimental Botany*, 71(5), 1706–1722. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA037>
- Emerson, R., & Arnold, W. (1932). THE PHOTOCHEMICAL REACTION IN PHOTOSYNTHESIS. *Journal of General Physiology*, 16(2), 191–205. <https://doi.org/10.1085/JGP.16.2.191>
- Fàbregas, N., & Fernie, A. R. (2019). The metabolic response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1077–1085. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERY437>
- Fang, H., & Gough, J. (2013a). dcGO: database of domain-centric ontologies on functions, phenotypes, diseases and more. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D536. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1080>
- Fang, H., & Gough, J. (2013b). A domain-centric solution to functional genomics via dcGO Predictor. *BMC Bioinformatics*, 14(SUPPL.3), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S3-S9/FIGURES/3>
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 2009 29:1, 29(1), 185–212. <https://doi.org/10.1051/AGRO:2008021>
- Fernandes, A. M., Fortini, E. A., Müller, L. A. de C., Batista, D. S., Vieira, L. M., Silva, P. O., Amaral, C. H. do, Poethig, R. S., & Otoni, W. C. (2020). Leaf development stages and ontogenetic changes in passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.) are detected by narrowband spectral signal. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111931. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2020.111931>
- Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A., Shen, R., Bryant, D. W., Fox, S. E., Wong, W. K., & Mockler, T. C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Genome Research*, 20(1), 45–58. <https://doi.org/10.1101/GR.093302.109>
- Flach, J., Pilet, P. E., & Jollès, P. (1992). What's new in chitinase research? *Experientia*, 48(8), 701–716. <https://doi.org/10.1007/BF02124285>

- Frank, H. A., & Brudvig, G. W. (2004). Redox functions of carotenoids in photosynthesis. *Biochemistry*, *43*(27), 8607–8615. <https://doi.org/10.1021/BI0492096>
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *17*(12), 3470–3488. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035659>
- Gallie, D. R. (2016). Eukaryotic initiation factor eIFiso4G1 and eIFiso4G2 are isoforms exhibiting distinct functional differences in supporting translation in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(3), 1501–1513. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692939>
- Gallino, J. P., Ruibal, C., Casaretto, E., Fleitas, A. L., Bonnacarrère, V., Borsani, O., & Vidal, S. (2018). A dehydration-induced eukaryotic translation initiation factor iso4G identified in a slow wilting soybean cultivar enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 262. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00262/BIBTEX>
- Gamon, J. A., Serrano, L., & Surfus, J. S. (1997). The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* *1997 112:4*, *112*(4), 492–501. <https://doi.org/10.1007/S004420050337>
- Gao, R., Liu, P., Yong, Y., & Wong, S.-M. (2016). Genome-wide transcriptomic analysis reveals correlation between higher WRKY61 expression and reduced symptom severity in Turnip crinkle virus infected *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/SREP24604>
- García-Castro, A., Volder, A., Restrepo-Díaz, H., Starman, T. W., & Lombardini, L. (2017). Evaluation of different drought stress regimens on growth, leaf gas exchange properties, and carboxylation activity in purple passionflower plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *142*(1), 57–64. <https://doi.org/10.21273/JASHS03961-16>
- Gehring, W. J. (1992). The homeobox in perspective. *Trends in Biochemical Sciences*, *17*(8), 277–280. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90434-B](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90434-B)
- Gilbert, G., & McLeman, R. (2010). Household access to capital and its effects on drought adaptation and migration: A case study of rural Alberta in the 1930s. *Population and Environment*, *32*(1), 3–26. <https://doi.org/10.1007/S11111-010-0112-2/TABLES/4>
- Gioppato, H. A., da Silva, M. B., Carrara, S., Palermo, B. R. Z., de Souza Moraes, T., & Dornelas, M. C. (2019). Genomic and transcriptomic approaches to understand *Passiflora* physiology and to contribute to passionfruit breeding. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, *31*(1), 173–181. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0134-1>
- Gitelson, A. A., Gritz, Y., & Merzlyak, M. N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant Physiology*, *160*(3), 271–282. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>

- Gomes, M. T. G., da Luz, A. C., dos Santos, M. R., do Carmo Pimentel Batitucci, M., Silva, D. M., & Falqueto, A. R. (2012). Drought tolerance of passion fruit plants assessed by the OJIP chlorophyll a fluorescence transient. *Scientia Horticulturae*, *142*, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2012.04.026>
- González-Fernández, A. B., Rodríguez-Pérez, J. R., Marcelo, V., & Valenciano, J. B. (2015). Using field spectrometry and a plant probe accessory to determine leaf water content in commercial vineyards. *Agricultural Water Management*, *156*, 43–50.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.03.024>
- Greenham, K., Guadagno, C. R., Gehan, M. A., Mockler, T. C., Weinig, C., Ewers, B. E., & McClung, C. R. (2017). Temporal network analysis identifies early physiological and transcriptomic indicators of mild drought in brassica rapa. *ELife*, *6*.
<https://doi.org/10.7554/eLife.29655>
- Guha, A., Sengupta, D., Kumar Rasineni, G., & Ramachandra Reddy, A. (2010). An integrated diagnostic approach to understand drought tolerance in mulberry (*Morus indica* L.). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *205*(2), 144–151.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2009.01.004>
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, *368*(6488), 266–269.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AA7614/ASSET/85DF5D35-16C3-4F44-A8B6-6FBF05AF8557/ASSETS/GRAPHIC/368_266_F4.JPEG
- Hansatech. (2006). *Handy PEA+ - Hansatech Instruments Ltd*. <http://www.hansatech-instruments.com/product/handy-pea/>
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. R., & Pereira, A. (2010). Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiology*, *154*(3), 1254–1271.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.161752>
- He, Y., Zhang, Y., Pereira, A., Gómez, A., & Wang, J. (2005). Nondestructive Determination of Tomato Fruit Quality Characteristics Using Vis/NIR Spectroscopy Technique. *International Journal of Information Technology*, *11*(11), 97–108.
https://www.researchgate.net/publication/242488503_Nondestructive_Determination_of_Tomato_Fruit_Quality_Characteristics_Using_VisNIR_Spectroscopy_Technique
- Hernández, A. (2003). *Revision taxonomica de Passiflora, subgénero Decaloba (Passifloraceae) en Colombia* [Tesis Pregrado]. Universidad Nacional de Colombia.
- Hoekstra, A. Y., & Mekonnen, M. M. (2012). The water footprint of humanity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(9), 3232–3237.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1109936109/SUPPL_FILE/PNAS.1109936109_SI.PDF
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, *6*(9), 431–438. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02052-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02052-0)

- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., & Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(35), 12987–12992.
https://doi.org/10.1073/PNAS.0604882103/SUPPL_FILE/04882FIG8.PDF
- Huang, S. H., Zhang, J. Y., Wang, L. H., & Huang, L. Q. (2013). Effect of abiotic stress on the abundance of different vitamin B6 vitamers in tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *66*, 63–67. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2013.02.010>
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., Bravo, H. C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K. D., Irizarry, R. A., Lawrence, M., Love, M. I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oles, A. K., ... Morgan, M. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods* *2015* *12*:2, *12*(2), 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
- Huete, A. R., Liu, H. Q., Batchily, K., & van Leeuwen, W. (1997). A comparison of vegetation indices over a global set of TM images for EOS-MODIS. *Remote Sensing of Environment*, *59*(3), 440–451. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(96\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(96)00112-5)
- Hurtado-Salazar, A., Pereira, D. F., Silva, D. A., Ceballos-Aguirre, N., Ocampo-Pérez, J., & Bruckner, C. H. (2020). Promissory Passiflora L. species (Passifloraceae) for tolerance to water-salt stress. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *14*(1), 44–49.
<https://doi.org/10.17584/RCCH.2020V14I1.10574>
- Hurtado-Salazar, A., Silva, D. F. P. da, Ceballos-Aguirre, N., Ocampo, J., & Bruckner, C. H. (2020). Promissory Passiflora species (Passifloraceae) for its tolerance to water-salt stress. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *14*(1), 44–49.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2020v14i1.10574>
- Hussain, S., Rao, M. J., Anjum, M. A., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., Ahmad, N., & Ahmad, S. (2019). Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions. *Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches*, 207–219.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_9/TABLES/3
- Jia, H., Wang, C., Wang, F., Liu, S., Li, G., & Guo, X. (2015). GhWRKY68 reduces resistance to salt and drought in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, *10*(3).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0120646>
- Jiang, C., Song, J., Huang, R., Huang, M., & Xu, L. (2013). Cloning and expression analysis of Chitinase genes from *Populus canadensis*. *Russian Journal of Plant Physiology* *2013* *60*:3, *60*(3), 396–403. <https://doi.org/10.1134/S1021443713030072>
- Jiang, Y., & Carrow, R. N. (2007). Broadband Spectral Reflectance Models of Turfgrass Species and Cultivars to Drought Stress. *Crop Science*, *47*(4), 1611–1618.
<https://doi.org/10.2135/CROPSCI2006.09.0617>

- Jiménez, A. M., Sierra, C. A., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., & Osorio, C. (2011). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, *44*(7), 1912–1918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.007>
- Joshi, R., Ramanarao, M. V., Lee, S., Kato, N., & Baisakh, N. (2014). Ectopic expression of ADP ribosylation factor 1 (SaARF1) from smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel) confers drought and salt tolerance in transgenic rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *117*(1), 17–30. <https://doi.org/10.1007/S11240-013-0416-X/FIGURES/9>
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, *7*(2016JULY), 1029. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01029/BIBTEX>
- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., Cetner, M. D., Łukasik, I., Goltsev, V., & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S11738-016-2113-Y/FIGURES/2>
- Katz, J. E., Dlakić, M., & Clarke, S. (2003). Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *2*(8), 525–540. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300037-MCP200>
- Kautsky, H., & Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* *19*:48, *19*(48), 964–964. <https://doi.org/10.1007/BF01516164>
- Kim, Y., Chung, Y. S., Lee, E., Tripathi, P., Heo, S., & Kim, K. H. (2020). Root Response to Drought Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Molecular Sciences* *2020*, Vol. *21*, Page *1513*, *21*(4), 1513. <https://doi.org/10.3390/IJMS21041513>
- Kohzuma, K., Cruz, J. A., Akashi, K., Hoshiyasu, S., Munekage, Y. N., Yokota, A., & Kramer, D. M. (2009). The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant, Cell & Environment*, *32*(3), 209–219. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2008.01912.X>
- Koramutla, M. K., Negi, M., & Ayele, B. T. (2021). Roles of Glutathione in Mediating Abscisic Acid Signaling and Its Regulation of Seed Dormancy and Drought Tolerance. *Genes* *2021*, Vol. *12*, Page *1620*, *12*(10), 1620. <https://doi.org/10.3390/GENES12101620>
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2015*(11), 951. <https://doi.org/10.1101/PDB.TOP084970>
- Kusvuran, S., & Dasgan, H. Y. (2017). Drought induced physiological and biochemical responses in *solanum lycopersicum* genotypes differing to tolerance. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, *16*(6), 19–27. <https://doi.org/10.24326/ASPHC.2017.6.2>
- Lamers, J., der Meer, T. van, & Testerink, C. (2020). How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiology*, *182*(4), 1624–1635. <https://doi.org/10.1104/PP.19.01464>

- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012 9:4, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lauriano, J. A., Ramalho, J. C., Lidon, F. C., & do Céu Matos, M. (2006). Mechanisms of energy dissipation in peanut under water stress. *Photosynthetica* 2006 44:3, 44(3), 404–410. <https://doi.org/10.1007/S11099-006-0043-4>
- Lawlor, D. W., & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 275–294. <https://doi.org/10.1046/J.0016-8025.2001.00814.X>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 2011 12:1, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP324>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lichtenthaler, H. K., Gitelson, A., & Lang, M. (1996). Non-Destructive Determination of Chlorophyll Content of Leaves of a Green and an Aurea Mutant of Tobacco by Reflectance Measurements. *Journal of Plant Physiology*, 148(3–4), 483–493. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80283-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80283-5)
- Lissina, E., Young, B., Urbanus, M. L., Guan, X. L., Lowenson, J., Hoon, S., Baryshnikova, A., Riezman, I., Michaut, M., Riezman, H., Cowen, L. E., Wenk, M. R., Clarke, S. G., Giaever, G., & Nislow, C. (2011). A Systems Biology Approach Reveals the Role of a Novel Methyltransferase in Response to Chemical Stress and Lipid Homeostasis. *PLOS Genetics*, 7(10), e1002332. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002332>
- Liu, S., Li, A., Chen, C., Cai, G., Zhang, L., Guo, C., & Xu, M. (2017). De novo transcriptome sequencing in *Passiflora edulis* Sims to identify genes and signaling pathways involved in cold tolerance. *Forests*, 8(11), 435. <https://doi.org/10.3390/f8110435>
- Lobos, G. A., & Hancock, J. F. (2015). Breeding blueberries for a changing global environment: A review. *Frontiers in Plant Science*, 6(SEPTEMBER), 782. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00782/XML/NLM>
- López-Hidalgo, C., Meijón, M., Lamelas, L., & Villedor, L. (2021). The rainbow protocol: A sequential method for quantifying pigments, sugars, free amino acids, phenolics, flavonoids and MDA from a small amount of sample. *Plant, Cell & Environment*, 44(6), 1977–1986. <https://doi.org/10.1111/PCE.14007>
- Love, M. I. (2021). Statistical Modeling of High Dimensional Counts. *Methods in Molecular Biology*, 2284, 97–134. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1307-8_7

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014a). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 2014 15:12, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014b). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8>
- Lozano-Montaña, P. A., Sarmiento, F., Mejía-Sequera, L. M., Álvarez-Flórez, F., & Melgarejo, L. M. (2021). Physiological, biochemical and transcriptional responses of *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* under progressive drought stress. *Scientia Horticulturae*, 275, 109655. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109655>
- Lozano-Povis, A., Alvarez-Montalván, C. E., & Moggiano, N. (2021). Climate change in the Andes and its impact on agriculture: a systematic review. In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 12, Issue 1, pp. 101–108). Universidad Nacional de Trujillo. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.012>
- Lu, T., Lu, G., Fan, D., Zhu, C., Li, W., Zhao, Q., Feng, Q., Zhao, Y., Guo, Y., Li, W., Huang, X., & Han, B. (2010). Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. *Genome Research*, 20(9), 1238–1249. <https://doi.org/10.1101/GR.106120.110>
- Ma, D., Dong, S., Zhang, S., Wei, X., Xie, Q., Ding, Q., Xia, R., & Zhang, X. (2021). Chromosome-level reference genome assembly provides insights into aroma biosynthesis in passion fruit (*Passiflora edulis*). *Molecular Ecology Resources*, 21(3), 955–968. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13310>
- Ma, P., Bai, T. hui, & Ma, F. wang. (2015). Effects of progressive drought on photosynthesis and partitioning of absorbed light in apple trees. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(4), 681–690. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60871-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60871-6)
- Mangena, P. (2019). Phytocystatins and their Potential Application in the Development of Drought Tolerance Plants in Soybeans (*Glycine max* L.). *Protein & Peptide Letters*, 27(2), 135–144. <https://doi.org/10.2174/0929866526666191014125453>
- Manivannan, P., Jaleel, C. A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G. M. A., & Panneerselvam, R. (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2007.05.002>
- Marcińska, I., Czyczyło-Mysza, I., Skrzypek, E., Filek, M., Grzesiak, S., Grzesiak, M. T., Janowiak, F., Hura, T., Dziurka, M., Dziurka, K., Nowakowska, A., & Quarrie, S. A. (2013). Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(2), 451–461. <https://doi.org/10.1007/S11738-012-1088-6/TABLES/2>

- Martínez-Barbáchano, R., & Solís-Miranda, G. A. (2018). Caracterización Espectral y Detección de Flecha Seca en Palma Africana en Puntarenas, Costa Rica. *Revista Geográfica de América Central*, 2(61), 349–377. <https://doi.org/10.15359/RGAC.61-2.13>
- Maseda, P. H., & Fernández, R. J. (2006). Stay wet or else: three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 3963–3977. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERL127>
- Mashaki, K. M., Garg, V., Nasrollahnezhad Ghomi, A. A., Kudapa, H., Chitikineni, A., Nezhad, K. Z., Yamchi, A., Soltanloo, H., Varshney, R. K., & Thudi, M. (2018). RNA-Seq analysis revealed genes associated with drought stress response in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PLOS ONE*, 13(6), e0199774. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0199774>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/JEXBOT/51.345.659>
- Mehta, P., Allakhverdiev, S., & Jajoo, A. (2010). Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynthesis Research*, 105(3), 249–255. <https://doi.org/10.1007/S11120-010-9588-Y>
- Melgarejo, L. M. (2011). Caracterización ecofisiológica de las plantas passiflora en áreas arboícolas de Colombia. *Revista de Horticultura*.
- Meneses, V. A. B., Téllez, J. M., & Velasquez, D. F. A. (2015). USO DE DRONES PARA EL ANALISIS DE IMÁGENES MULTIESPECTRALES EN AGRICULTURA DE PRECISIÓN. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13(1), 28–40. <https://doi.org/10.24054/16927125.V1.N1.2015.1647>
- Meng, A., Wen, D., & Zhang, C. (2022). Maize Seed Germination Under Low-Temperature Stress Impacts Seedling Growth Under Normal Temperature by Modulating Photosynthesis and Antioxidant Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 13, 514. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.843033/BIBTEX>
- Meza, K., Ruales, B., Manguashca, J., & Rivadeneira, J. L. (2020). CARACTERIZACIÓN ESPECTRAL DE ESTRÉS HÍDRICO EN EL CULTIVO DE PEPINO DULCE (*Solanum muricatum*). *Revista Geoespacial*, 17(1), 14–24. <https://doi.org/10.24133/geoespacial.v17i1.1492>
- Ministerio de Agricultura. (2020). *Informe Gulupa*. <https://www.minagricultura.gov.co/paginas/default.aspx>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA913>
- Mofatto, L. S., Carneiro, F. de A., Vieira, N. G., Duarte, K. E., Vidal, R. O., Alekcevetch, J. C., Cotta, M. G., Verdeil, J. L., Lapeyre-Montes, F., Lartaud, M., Leroy, T., de Bellis, F., Pot, D., Rodrigues, G. C., Carazzolle, M. F., Pereira, G. A. G., Andrade, A. C., & Marraccini, P. (2016).

- Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12870-016-0777-5/FIGURES/7>
- Mohammadkhani, N., & Heidari, R. (2007). Effects of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water content in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *10*(22), 4022–4028. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.4022.4028>
- Moreno, S. G., Vela, H. P., & Alvarez, M. O. S. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, *27*(4), 119–129.
- Morimoto, K., Mizoi, J., Qin, F., Kim, J.-S., Sato, H., Osakabe, Y., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Stabilization of Arabidopsis DREB2A Is Required but Not Sufficient for the Induction of Target Genes under Conditions of Stress. *PLoS ONE*, *8*(12), e80457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080457>
- Mutz, K. O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J. G., & Stahl, F. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 22–30). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.004>
- Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiology*, *149*(1), 88–95. <https://doi.org/10.1104/PP.108.129791>
- Nakayama, S., Moncrief, N. D., & Kretsinger, R. H. (1992). Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. *Journal of Molecular Evolution*, *34*(5), 416–448. <https://doi.org/10.1007/BF00162998>
- Naramoto, S., Kleine-Vehn, J., Robert, S., Fujimoto, M., Dainobu, T., Paciorek, T., Ueda, T., Nakano, A., van Montagu, M. C. E., Fukuda, H., & Friml, J. (2010). ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(50), 21890–21895. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1016260107/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Nezhadahmadi, A., Prodhon, Z. H., & Faruq, G. (2013). Drought tolerance in wheat. *TheScientificWorldJournal*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/610721>
- Niu, J., Zhang, S., Liu, S., Ma, H., Chen, J., Shen, Q., Ge, C., Zhang, X., Pang, C., & Zhao, X. (2018). The compensation effects of physiology and yield in cotton after drought stress. *Journal of Plant Physiology*, *224–225*, 30–48. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2018.03.001>
- Noodén, L. D. (2004). *Plant cell death processes*. 392.
- Ocampo Pérez, J., & Wyckhuys, K. (2012). *Tecnología para el cultivo de la gulupa en Colombia. :(Passiflora edulis f. edulis sims)*. Centro de Bio-Sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, República de Colombia. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13557?locale-attribute=es>

- Ostberg, S., Schewe, J., Childers, K., & Frieler, K. (2018). Changes in crop yields and their variability at different levels of global warming. *Earth System Dynamics*, 9(2), 479–496. <https://doi.org/10.5194/ESD-9-479-2018>
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., & Popovic, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 80–85. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2011.11.012>
- Passioura, J. B. (2002). 'Soil conditions and plant growth.' *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 311–318. <https://doi.org/10.1046/J.0016-8025.2001.00802.X>
- Peñuelas, J., & Inoue, Y. (1999). Reflectance Indices Indicative of Changes in Water and Pigment Contents of Peanut and Wheat Leaves. *Photosynthetica* 1999 36:3, 36(3), 355–360. <https://doi.org/10.1023/A:1007033503276>
- Penuelas, J., Pinol, J., Ogaya, R., & Filella, I. (2010). Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R900/R970). <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/014311697217396>, 18(13), 2869–2875. <https://doi.org/10.1080/014311697217396>
- Perea Dallos, M., Matallana Ramirez, L., & Tirado Perea, A. (2010). *Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales*. Universidad Nacional de Colombia.
- Perez Martinez, L. V., & Melgarejo, L. M. (2015). Photosynthetic performance and leaf water potential og gulupa (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae) in the reproductive phase in three locations in the Colombian Andes. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 183–194. <https://doi.org/10.15446/ABC.V20N1.42196>
- Pierre, Y., Breyton, C., Kramer, D., & Popot, J. L. (1995). Purification and characterization of the cytochrome b6 f complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29342–29349. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29342>
- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869–882. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340>
- Pinter, P. J., Hatfield, J. L., Schepers, J. S., Barnes, E. M., Moran, M. S., Daughtry, C. S. T., & Upchurch, D. R. (2003). Remote sensing for crop management. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing*, 69(6), 647–664. <https://doi.org/10.14358/PERS.69.6.647>
- Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A., & Mittler, R. (2002). Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *The Plant Journal*, 31(3), 319–330. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01364.X>
- Polosoro, A., Enggarini, W., & Ohmido, N. (2019). Global epigenetic changes of histone modification under environmental stresses in rice root. *Chromosome Research*, 27(4), 287–298. <https://doi.org/10.1007/S10577-019-09611-3/FIGURES/5>

- Ponce, C. (2020). Intra-seasonal climate variability and crop diversification strategies in the Peruvian Andes: A word of caution on the sustainability of adaptation to climate change. *World Development*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2019.104740>
- Posada, C. C., & Posada, C. C. (2007). La adaptación al cambio climático en Colombia. *Revista de Ingeniería*, 0(26), 74–80. <https://doi.org/10.16924/riua.v0i26.298>
- Qi, J., Song, C. P., Wang, B., Zhou, J., Kangasjärvi, J., Zhu, J. K., & Gong, Z. (2018). Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(9), 805–826. <https://doi.org/10.1111/JIPB.12654>
- Qiu, W., Su, W., Cai, Z., Dong, L., Li, C., Xin, M., Fang, W., Liu, Y., Wang, X., Huang, Z., Ren, H., & Wu, Z. (2020). Combined analysis of transcriptome and metabolome reveals the potential mechanism of coloration and fruit quality in yellow and purple *Passiflora edulis* Sims. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(43), 12096–12106. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03619>
- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K. I., & John, R. (2017). Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>
- Rallo, G., Minacapilli, M., Ciralo, G., & Provenzano, G. (2014). Detecting crop water status in mature olive groves using vegetation spectral measurements. *Biosystems Engineering*, 128, 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.08.012>
- Razi, K., & Muneer, S. (2021). Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874280>, 41(5), 669–691. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874280>
- Reddy, A. S. N. (2001). Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Science*, 160(3), 381–404. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00386-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00386-1)
- Redillas, M. C. F. R., Kim, J.-K., Strasser, R. J., Jeong, J. S., & Kim, Y.-S. (2011). The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. *Plant Biotechnology Reports*, 5(2), 169–175.
- Rivas-Ubach, A., Sardans, J., Pérez-Trujillo, M., Estiarte, M., & Penñelas, J. (2012). Strong relationship between elemental stoichiometry and metabolome in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4181–4186. https://doi.org/10.1073/PNAS.1116092109/SUPPL_FILE/ST06.DOCX
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP616>
- Rodrigues, D. L., Viana, A. P., Vieira, H. D., Santos, E. A., de Lima e Silva, F. H., & Santos, C. L. (2017). Contribution of production and seed variables to the genetic divergence in passion

- fruit under different nutrient availabilities. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(8), 607–614. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000800006>
- Rodríguez, N., Armenteras, D., & Retana, J. (2015). National ecosystems services priorities for planning carbon and water resource management in Colombia. *Land Use Policy*, 42, 609–618. <https://doi.org/10.1016/J.LANDUSEPOL.2014.09.013>
- Rolly, N. K., Mun, B. G., & Yun, B. W. (2021a). Insights into the Transcriptional Regulation of Branching Hormonal Signaling Pathways Genes under Drought Stress in Arabidopsis. *Genes*, 12(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/GENES12020298>
- Rolly, N. K., Mun, B.-G., & Yun, B.-W. (2021b). Insights into the Transcriptional Regulation of Branching Hormonal Signaling Pathways Genes under Drought Stress in Arabidopsis. *Genes* 2021, Vol. 12, Page 298, 12(2), 298. <https://doi.org/10.3390/GENES12020298>
- Safriel, U., Lead, Z. A., Niemeijer, D., Puigdefabregas, J., White, R., Lal, R., Winslow, M., Ziedler, J., Prince, S., Archer, E., King, C., Shapiro, B., Wessels, K., Nielsen, T., Portnov, B., Reshef, I., Thonell, J., Lachman, E., & Mcnab, D. (2005). Dryland Systems. In M. El-Kassas & E. Ezcurra (Eds.), *Millennium Ecosystem Assessment – Ecosystems and Human well-being*. World Resources Institute.
- Salehi-Lisar, S. Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). *Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance BT - Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry*. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4_1
- Schulze, E. D. (2003). Carbon Dioxide and Water Vapor Exchange in Response to Drought in the Atmosphere and in the Soil. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 247–274. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PP.37.060186.001335>
- Seo, P. J., Lee, S. B., Suh, M. C., Park, M. J., & Park, C. M. (2011). The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in arabidopsis. *Plant Cell*, 23(3), 1138–1152. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083485>
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221–227. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERL164>
- Sousa, A., Souza, M., Melo, C., & Sodr e, G. (2015). ISSR markers in wild species of Passiflora L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 14(4), 18534–18545. <https://doi.org/10.4238/2015.DECEMBER.23.41>
- Souza, P. U., Lima, L. K. S., Soares, T. L., Jesus, O. N. de, Coelho Filho, M. A., & Girardi, E. A. (2018). Biometric, physiological and anatomical responses of Passiflora spp. to controlled water deficit. *Scientia Horticulturae*, 229, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.019>
- Spang, A., Shiba, Y., & Randazzo, P. A. (2010). ArfGAPs: gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Letters*, 584(12), 2646. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.04.005>

- Sposito, V., Faggian, R., Romeijn, H., & Downey, M. (2013). Expert Systems Modeling for Assessing Climate Change Impacts and Adaptation in Agricultural Systems at Regional Level. *Open Journal of Applied Sciences*, *03*, 369–380.
<https://doi.org/10.4236/OJAPPS.2013.36047>
- Stamm, M. D., Enders, L. S., Donze-Reiner, T. J., Baxendale, F. P., Siegfried, B. D., & Heng-Moss, T. M. (2014). Transcriptional response of soybean to thiamethoxam seed treatment in the presence and absence of drought stress. *BMC Genomics*, *15*(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1055/FIGURES/2>
- Sterling, A., & Melgarejo, L. M. (2020). Leaf spectral reflectance of *Hevea brasiliensis* in response to *Pseudocercospora ulei*. *European Journal of Plant Pathology*, *156*(4), 1063–1076. <https://doi.org/10.1007/S10658-020-01961-7/TABLES/4>
- Strauss, A. J., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., & Heerden, P. D. R. V. (2006). Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environmental and Experimental Botany*, *56*(2), 147–157.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2005.01.011>
- Suseela, V., Tharayil, N., Xing, B., & Dukes, J. S. (2015). Warming and drought differentially influence the production and resorption of elemental and metabolic nitrogen pools in *Quercus rubra*. *Global Change Biology*, *21*(11), 4177–4195.
<https://doi.org/10.1111/GCB.13033>
- Svensson, B., Svendsen, I., Poulsen, F. M., Højrup, P., Roepstorff, P., & Ludvigsen, S. (1992). Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry*, *31*(37), 8767–8770. <https://doi.org/10.1021/BI00152A012>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *FISIOLOGIA VEGETAL*. www.sinauer.com
- Takizawa, K., Kanazawa, A., & Kramer, D. M. (2008). Depletion of stromal P(i) induces high “energy-dependent” antenna exciton quenching (q(E)) by decreasing proton conductivity at CF(O)-CF(1) ATP synthase. *Plant, Cell & Environment*, *31*(2), 235–243.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2007.01753.X>
- Tang, S., Liang, H., Yan, D., Zhao, Y., Han, X., Carlson, J. E., Xia, X., & Yin, W. (2013). *Populus euphratica*: The transcriptomic response to drought stress. *Plant Molecular Biology*, *83*(6), 539–557. <https://doi.org/10.1007/S11103-013-0107-3/TABLES/4>
- Tucker, C. J. (1979). Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sensing of Environment*, *8*(2), 127–150. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0)
- Urrutia, R., & Vuille, M. (2009). Climate change projections for the tropical Andes using a regional climate model: Temperature and precipitation simulations for the end of the 21st century. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, *114*(2).
<https://doi.org/10.1029/2008JD011021>

- Vancostenoble, B., Blanchet, N., Langlade, N. B., & Bailly, C. (2022). Maternal drought stress induces abiotic stress tolerance to the progeny at the germination stage in sunflower. *Environmental and Experimental Botany*, 201, 104939. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2022.104939>
- Vanwallendael, A., Soltani, A., Emery, N. C., Peixoto, M. M., Olsen, J., & Lowry, D. B. (2019). A Molecular View of Plant Local Adaptation: Incorporating Stress-Response Networks. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 70, pp. 559–583). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100114>
- Vicente, M. J., Martínez-Díaz, E., Martínez-Sánchez, J. J., Franco, J. A., Bañón, S., & Conesa, E. (2020). Effect of light, temperature, and salinity and drought stresses on seed germination of *Hypericum ericoides*, a wild plant with ornamental potential. *Scientia Horticulturae*, 270, 109433. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2020.109433>
- Vila, H. F., Hugalde, I. P., & di Filippo, M. L. (2011). Estimación de potencial hídrico en vid por medio de medidas termográficas y espectrales. *RIA 37 (1) : 46-53 (Abril 2011)*. <http://repositorio.inta.gob.ar:80/handle/20.500.12123/6387>
- Vitousek, P. (2015). Nutrient Cycling and Nutrient Use Efficiency. <https://doi.org/10.1086/283931>, 119(4), 553–572. <https://doi.org/10.1086/283931>
- Wang, M., Newsham, I., Wu, Y. Q., Dinh, H., Kovar, C., Santibanez, J., Sabo, A., Reid, J., Bainbridge, M., Boerwinkle, E., Albert, T., Gibbs, R., & Muzny, D. (2011). High-Throughput Next Generation Sequencing Methods and Applications. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 22(Suppl), S7. [/pmc/articles/PMC3186667/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2186667/)
- Wang, N., Xiao, B., & Xiong, L. (2011). Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice. *Journal of Plant Physiology*, 168(18), 2212–2224. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2011.07.013>
- Wang, S., & Gribskov, M. (2017). Comprehensive evaluation of de novo transcriptome assembly programs and their effects on differential gene expression analysis. *Bioinformatics*, 33(3), 327–333. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW625>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 10, Issue 1, pp. 57–63). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wilke, A. B. B., Beier, J. C., & Benelli, G. (2019). Complexity of the relationship between global warming and urbanization – an obscure future for predicting increases in vector-borne infectious diseases. *Current Opinion in Insect Science*, 35, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2019.06.002>
- Wingett, S. W., & Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, 7, 1338. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15931.2>

- Wu, M., Zhang, W. H., Ma, C., & Zhou, J. Y. (2013). Changes in morphological, physiological, and biochemical responses to different levels of drought stress in chinese cork oak (*Quercus variabilis* Bl.) seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 2013 60:5, 60(5), 681–692. <https://doi.org/10.1134/S1021443713030151>
- Wu, Y., Tian, Q., Huang, W., Liu, J., Xia, X., Yang, X., & Mou, H. (2020). Identification and evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Passiflora edulis* under stem rot condition. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2951–2962. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05385-8>
- Xia, Z., Huang, D., Zhang, S., Wang, W., Ma, F., Wu, B., Xu, Y., Xu, B., Chen, D., Zou, M., Xu, H., Zhou, X., Zhan, R., & Song, S. (2021). Chromosome-scale genome assembly provides insights into the evolution and flavor synthesis of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Horticulture Research* 2021 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00455-1>
- Xiong, F., Li, X., Zheng, L., Hu, N., Cui, M., & Li, H. (2019). Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Passiflora edulis* Sims peel under different degradation methods. *Carbohydrate Polymers*, 218, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.069>
- Xu, J., & Scheres, B. (2005). Dissection of Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 Function in Epidermal Cell Polarity. *The Plant Cell*, 17(2), 525. <https://doi.org/10.1105/TPC.104.028449>
- Xu, M., Li, A., Teng, Y., & Sun, Z. (2019). Exploring the adaptive mechanism of *Passiflora edulis* in karst areas via an integrative analysis of nutrient elements and transcriptional profiles. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1797-8>
- Xu, W., Cui, K., Xu, A., Nie, L., Huang, J., & Peng, S. (2015). Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1760-0>
- Xue, F., Liu, W., Cao, H., Song, L., Ji, S., Tong, L., & Ding, R. (2021). Stomatal conductance of tomato leaves is regulated by both abscisic acid and leaf water potential under combined water and salt stress. *Physiologia Plantarum*, 172(4), 2070–2078. <https://doi.org/10.1111/PPL.13441>
- Yang, I. S., & Kim, S. (2015). Analysis of Whole Transcriptome Sequencing Data: Workflow and Software. *Genomics & Informatics*, 13(4), 119. <https://doi.org/10.5808/GI.2015.13.4.119>
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae* 2021, Vol. 7, Page 50, 7(3), 50. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7030050>
- Yi, X. P., Zhang, Y. L., Yao, H. S., Luo, H. H., Gou, L., Chow, W. S., & Zhang, W. F. (2016). Rapid recovery of photosynthetic rate following soil water deficit and re-watering in cotton

- plants (*Gossypium herbaceum* L.) is related to the stability of the photosystems. *Journal of Plant Physiology*, *194*, 23–34. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2016.01.016>
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2000). Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. *Photosynthetica*, *38*(2), 171–186. <https://doi.org/10.1023/A:1007201411474>
- Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Omics Approaches Toward Defining the Comprehensive Abscisic Acid Signaling Network in Plants. *Plant & Cell Physiology*, *56*(6), 1043–1052. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCV060>
- You, J., Zhang, Y., Liu, A., Li, D., Wang, X., Dossa, K., Zhou, R., Yu, J., Zhang, Y., Wang, L., & Zhang, X. (2019). Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. *BMC Plant Biology*, *19*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12870-019-1880-1/FIGURES/9>
- Zaefyzadeh, M., Quliyev, R. A., Babayeva, S. M., & Abbasov, M. A. (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of Biology*, *33*(1), 1–7.
- Zeng, H., Zhang, Y., Zhang, X., Pi, E., & Zhu, Y. (2017). Analysis of EF-hand proteins in soybean genome suggests their potential roles in environmental and nutritional stress signaling. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 877. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00877/BIBTEX>
- Zhang, X., & Cheng, X. (2003). Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure*, *11*(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00071-6)
- Zhang, X., Lei, L., Lai, J., Zhao, H., & Song, W. (2018). Effects of drought stress and water recovery on physiological responses and gene expression in maize seedlings. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12870-018-1281-X/FIGURES/7>
- Zhang, X., Yang, Z., Li, Z., Zhang, F., & Hao, L. (2019). De novo transcriptome assembly and co-expression network analysis of *Cynanchum thesioides*: Identification of genes involved in resistance to drought stress. *Gene*, *710*, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.055>
- Zhao, P., Hou, S., Guo, X., Jia, J., Yang, W., Liu, Z., Chen, S., Li, X., Qi, D., Liu, G., & Cheng, L. (2019). A MYB-related transcription factor from sheepgrass, LcMYB2, promotes seed germination and root growth under drought stress. *BMC Plant Biology*, *19*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12870-019-2159-2/FIGURES/9>
- Zhou, J.-J., Zhang, Y.-H., Han, Z.-M., Liu, X.-Y., Jian, Y.-F., Hu, C.-G., Dian, Y.-Y., Zhou, J.-J. ;, Zhang, Y.-H. ;, Han, Z.-M. ;, Liu, X.-Y. ;, Jian, Y.-F. ;, Hu, C.-G. ;, & Dian, Y.-Y. (2021). Evaluating the Performance of Hyperspectral Leaf Reflectance to Detect Water Stress and Estimation of Photosynthetic Capacities. *Remote Sensing 2021, Vol. 13, Page 2160*, *13*(11), 2160. <https://doi.org/10.3390/RS13112160>

- Zhu, A., Ibrahim, J. G., & Love, M. I. (2019). Heavy-tailed prior distributions for sequence count data: removing the noise and preserving large differences. *Bioinformatics*, *35*(12), 2084–2092. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY895>
- Zhuang, J., Wang, Y., Chi, Y., Zhou, L., Chen, J., Zhou, W., Song, J., Zhao, N., & Ding, J. (2020). Drought stress strengthens the link between chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic traits. *PeerJ*, *8*, e10046. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.10046/SUPP-1>
- Zivcak, M., Brestic, M., Balatova, Z., Drevenakova, P., Olsovska, K., Kalaji, H. M., Yang, X., & Allakhverdiev, S. I. (2013). Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynthesis Research*, *117*(1–3), 529–546. <https://doi.org/10.1007/S11120-013-9885-3>
- Zivcak, M., Olsovska, K., & Brestic, M. (2017). Photosynthetic responses under harmful and changing environment: Practical aspects in crop research. *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications*, 203–248. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8_10
- Zolnierowicz, S. (2000). Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*, *60*(8), 1225–1235. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00424-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00424-X)