



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN *FAGOPYRUM ESCULENTUM* (POLYGONACEAE) EN CONDICIONES DE ESTRÉS POR METALES.

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ANA CAROLINA GONZÁLEZ TRILLO

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. MARÍA DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA  
FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Enero, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, me permitió obtener conocimientos y enseñanzas muy valiosos para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al proyecto PAPIIT con clave IN205912 titulado: “Estudio comparativo a nivel molecular y fisiológico de la tolerancia a metales de *Fagopyrum esculentum* Moench (Polygonaceae)” por el financiamiento para la realización de esta tesis.

Al proyecto PAPIIT con clave IN20815 titulado: “Mecanismos de tolerancia al aluminio en una planta tolerante: el papel de transportadores y del sistema antioxidante” por el financiamiento otorgado para concluir este trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el financiamiento otorgado para la asistencia y presentación de cartel en el congreso internacional “Plant Biology” realizado en julio del 2014 en la ciudad de Portland, E.U.A.

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por su gran esfuerzo, dedicación y calidez humana durante el transcurso de este trabajo, por brindarme su valiosa asesoría y dirección, por darme la oportunidad de alcanzar esta meta.

A los miembros del comité tutor: Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra del Departamento de Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Un agradecimiento a Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, José Luis Santillán Torres y Jorge Ramírez Salcedo, de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la asistencia técnica en las determinaciones del microarreglo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega que me dio la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, le agradezco por su calidad humana y por permitirme tener su amistad. A pesar de los obstáculos y dificultades, me brindó siempre su apoyo incondicional y sus palabras de aliento cuando más lo necesitaba. Le agradezco por su perseverancia, por enseñarme valiosas lecciones tanto académicas, como de vida.

A mi familia, que nunca desconfió de mí. Siempre estuvo a mi lado, gracias a su cariño y apoyo, permanecí al pie del cañón, sin renunciar a esta gran meta. Gracias a mi madre, por ella tuve la fuerza para continuar.

A mis hermanos, que son una gran inspiración para mí, los considero grandes personas, llenos de cualidades y virtudes, son mi ejemplo para no dejarme vencer.

A mi pareja Ignacio Pacheco Bernal, que sin él este sueño jamás se hubiera hecho realidad. Le agradezco por el amor que día a día me brinda, le estoy sumamente agradecida en todos los aspectos, me ha permitido crecer y me ha enseñado el valor de la familia y el amor. Le agradezco por darme la oportunidad de conocer a su hermosa familia, la cual ha sido una gran inspiración para mí.

A todo el equipo del laboratorio, a Teresita, por su valioso trabajo y su calidad humana. A la Dra. Paola Isabel Angulo Bejarano, por su amistad incondicional, por tener siempre una buena actitud hacia la vida, por nunca dejarse vencer, por ser mi ejemplo de vida y por la ayuda brindada para concluir este trabajo. A la M.C. Natalia Gutierréz, por su compañía durante mi estadía en la maestría. A Violeta, Arely, Coral y Brenda, por la buena convivencia en el laboratorio, por su juventud y motivación.

A todos mis buenos amigos, Ceci, Magy, Jaz, Mary Elena, Román, Cristina, Daniela, que no me dejaron caer, que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, que me permiten conocer su filosofía de vida, a cada uno de ellos los estimo en gran medida y son para mí increíbles.

## Contenido

<b>Resumen.....</b>	
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problema de la contaminación del suelo por metales.....	1
1.2 Toxicidad por metales en plantas.....	3
1.3 Mecanismos de tolerancia.....	5
1.3.1 Restricción en la captación y transporte.....	5
1.3.2 Mecanismos de tolerancia interna.....	8
1.4 Respuesta de defensa común a los metales.....	11
1.5 Modelo de estudio: <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench var. Mancan.....	12
1.4.1 Tolerancia de <i>Fagopyrum esculentum</i> a los metales.....	15
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Objetivo general:.....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivos particulares:.....	18

<b>4. Materiales y Métodos .....</b>	<b>19</b>
4.1 Material vegetal .....	19
4.2 Ensayo de microarreglos .....	19
<u>4.2.1 Extracción de RNA total</u> .....	20
<u>4.2.2 Preparación de la sonda y la hibridación de arrays.</u> .....	21
<u>4.2.3 Adquisición de datos y análisis de las imágenes de la matriz</u> .....	21
4.3 Selección de genes para el aislamiento y clonación de la secuencia parcial .....	23
4.4 Aislamiento, clonación y secuenciación de fragmentos de los genes seleccionados.....	23
<u>4.4.1 Diseño de cebadores degenerados</u> .....	23
<u>4.4.2 Diseño de cebadores específicos.</u> .....	25
<u>4.4.4 Purificación de productos positivos</u> .....	29
<u>4.5.1 PCR Semi-cuantitativa</u> .....	31
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>33</b>
5.1 Análisis de datos de los microarreglos. ....	33

5.1.1 <u>Identificación de los genes de respuesta común a los metales a las 24 y 48 h.</u>	33
5.1.3 Características de los genes de alta expresión en respuesta común a los metales a las 48 h de exposición	41
5.2 Genes seleccionados para clonación y secuenciación	49
5.3. Clonación y aislamiento de secuencias parciales de algunos de los genes compartidos a las 24 h en respuesta a los metales	50
5.3.1 <u>Secuencia parcial del gen <i>FeYSL3</i></u>	50
5.3.2 <u>Secuencia parcial del gen <i>FeYSL1</i></u>	61
5.3.3 <u>Secuencia parcial del gen <i>FeASA2</i></u>	67
5.3.4 <u>Secuencia parcial del gen <i>FeZEP</i></u>	71
5.4 Expresión por PCR semi-cuantitativa	73
5.4.1 <u>Expresión del gen <i>FeYSL1</i></u>	74
5.4.3 <u>Expresión del gen <i>FeASA2<math>\alpha</math></i></u>	81
<b>Conclusiones y consideraciones finales</b>	<b>85</b>
<b>Referencias</b>	<b>87</b>

## Anexo. Determinación de los ciclos de amplificación y secuencias parciales de los genes ..... 98

### Figuras

Figura 1. Reacciones de Haber-Weiss y Fenton.....	4
Figura 2. <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench .....	14
Figura 3. Tasa relativa de crecimiento de la raíz (RRG %) de <i>F. esculentum</i> a diferentes concentraciones de Al. ....	16
Figura 4. Gráficas de dispersión de datos de microarreglos por hibridación competitiva, usando muestras de raíces de <i>F. esculentum</i> .. ....	34
Figura 5. Gráficas de dispersión de datos de microarreglos por hibridación competitiva, usando muestras de raíces de <i>F. esculentum</i> .. ....	35
Figura 6. Diagramas de Venn: Número de genes de alta expresión ( $z$ -score $\geq 1.5$ ) de respuesta única para cada metal y de respuesta común para los metales Al, Cu y Zn. ....	36
Figura 7. Distribución por porcentajes de los grupos de genes de alta expresión (en respuesta común a los metales a las 24 h) en categorías funcionales por ontologías de MapMan.....	38
Figura 8. Diagrama integrativo de la respuesta a nivel transcripcional y celular de <i>F. esculentum</i> en común a los metales Al, Cu y Zn a las 24 h de tratamiento. ....	41

Figura 9. Distribución por porcentajes de los grupos de genes de alta expresión (en respuesta común a los metales a las 48 h) en categorías funcionales por ontologías de MapMan.....	44
Figura 10. Diagrama integrativo de la respuesta a nivel transcripcional y celular de <i>F. esculentum</i> en común a los metales Al, Cu y Zn a las 48 h de tratamiento. ....	48
Figura 11. Secuencia parcial (753 pb) del gen <i>FeYSL3</i> .....	51
Figura 12. Análisis de la secuencia parcial del gen <i>FeYSL3</i> .....	52
Figura 13. Alineamiento entre fragmentos de secuencias de <i>FeYSL3</i> .....	54
Figura 14. Análisis de la segunda secuencia parcial del gen <i>FeYSL3</i> .. ....	56
Figura 15. Análisis de topología proteica. ....	58
Figura 16. Dominio de bucle variable en la familia de transportadores YSL. ....	60
Figura 17. Secuencia parcial (484 pb) del gen <i>FeYSL1</i> .....	61
Figura 18. Alineamiento entre fragmentos de secuencias de <i>FeYSL1</i> .....	63
Figura 19. Análisis de la secuencia parcial de <i>FeYSL1</i> .....	64
Figura 20. Análisis de topología proteica. ....	65
Figura 21. Dominio de bucle variable en la familia de transportadores YSL. ....	66

Figura 22. Secuencia parcial (375 pb) del gen <i>FeASA2α</i> .....	68
Figura 23. Alineamiento de <i>FeASA2</i> conservados entre las secuencias con secuencias de <i>AtASA1</i> y <i>AtASA2</i> . .....	69
Figura 24. Análisis de la secuencia proteica de FeASA.. .....	70
Figura 25. Secuencia parcial del gen <i>FeZEP</i> (630 pb).....	72
Figura 26. Análisis de expresión del gen <i>FeYSL1</i> .....	75
Figura 27. Análisis de expresión del gen <i>FeYSL3</i> .....	79
Figura 28. Análisis de expresión del gen <i>FeASA2α</i> .....	83

## Tablas

Tabla 1. Genes seleccionados y número de accesoión o ID en TAIR .....	24
Tabla 2. Secuencias de los oligonucléotidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR. ...	25
Tabla 3. Secuencias de los oligonucléotidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR..	26
Tabla 4. Secuencias de los oligonucléotidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR. ...	26
Tabla 5. Secuencias de los oligonucléotidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR. ...	28

Tabla 6. Medidas de la densitometría (Densidad integrada) de las bandas en los geles de corrida.  
Expresión relativa normalizada y % de cambio con respecto al valor de la condición control. ....76

Tabla 7. Medidas de la densitometría (Densidad integrada) de las bandas en los geles de corrida. .... 80

Tabla 8. Medidas de la densitometría (Densidad integrada) de las bandas en los geles de corrida.  
Expresión relativa normalizada y del % de cambio con respecto al valor de la condición control..... 84

# Resumen

La contaminación de los suelos con altas concentraciones de metales es un problema que se ha incrementado por el avance de la actividad minero-metalúrgica a lo largo de la historia. Aunado a este problema, la acidez de los suelos ocasiona efectos de toxicidad en plantas susceptibles, debido que a un pH ácido existe un aumento en la absorción de las formas biodisponibles de los metales. En las plantas, la toxicidad por metales ocasiona como principales síntomas visibles, la inhibición en el crecimiento de la raíz primaria y clorosis foliar, sin embargo, se ha visto que algunas especies de plantas son capaces de tolerar estas condiciones. La tolerancia significa una reducción en la absorción de los metales, la activación de mecanismos internos de la planta para contender con estas condiciones de estrés (tales como la respuesta al estrés oxidativo) y la acumulación de metales en el interior de la misma, lo que permite mantener la homeostasis y la integridad de las células. Estos mecanismos de tolerancia en la planta requieren una coordinación de procesos fisiológicos y bioquímicos algunos de los cuáles requieren de cambios en la expresión génica global. Sin embargo, la integración de los mecanismos de tolerancia para generar una respuesta fenotípica actualmente sigue siendo objeto de estudio.

*Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) puede tolerar altas concentraciones de aluminio (Al) mediante la acumulación en sus hojas, y se ha reportado ser tolerante también a cobre (Cu) y zinc (Zn). Estudios anteriores, en el laboratorio, con plántulas de 2 días de edad, mostraron que *F. esculentum* responde de manera general al Al, Cu o Zn, presentando una inhibición en el crecimiento de la raíz en las primeras horas de exposición (0-48 h) y recuperando su crecimiento y desarrollo de manera normal a tiempos posteriores (72 h en adelante). Para conocer cuáles son los genes que participan en la respuesta fenotípica que es común a éstos tres metales, se realizó un análisis comparativo de transcriptomas de puntas de raíz ( $\approx 1$  cm) utilizando la tecnología de microarreglos, exponiendo a plántulas de *F. esculentum* a los iones metálicos Al, Cu y Zn (de manera independiente) durante 24 y 48 h. Se determinó que 264 genes son inducidos ( $z \geq 1.5$ ) en común en respuesta a los tres metales a las 24 h, y sólo 51 genes son compartidos a las 48 h. El análisis funcional de los grupos de genes en común a Al, Cu y Zn, reveló que a las 24 h en *F. esculentum*, existen genes inducidos que ya han sido reportados por su participación en respuesta a diferentes metales en diversas plantas tolerantes o sensibles, genes tales como los transportadores de metales: *ZIP10* (*ZINC TRANSPORTER 10 PRECURSOR*), *ATMRP1* (*MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1*), *YSL1* (*YELLOW STIPE LIKE 1*) y *MATE* (*MULTI-ANTIMICROBIAL EXTRUSION PROTEIN*); genes de respuesta antioxidante como *TH2* (*THIOREDOXIN F2*);

y genes implicados en la ligación de metales en el citoplasma *PCS1* (*PHYTOCHELATIN SYNTHASE 1*); también se encontraron genes que codifican para proteínas implicadas en la síntesis o percepción de la hormonas como *ERF2* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR-2*), *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE 1*), genes del tipo *SAUR* (*SMALL AUXIN UPREGULATED*) de respuesta regulada por auxinas y el gen *ZEP* (*ZEAXANTHIN EPOXIDASE*). De estos genes se seleccionaron para su clonación los genes *FeYSL1* (*YELLOW STRIPE LIKE 1*), dos formas no alélicas del gen *FeYSL3* (*YELLOW STRIPE LIKE 3*), *FeZEP* (*ZEAXANTHIN EPOXIDASE*) y *FeASA2* (*ANTHRANILATE SYNTHASE  $\alpha$ 2*) de los cuales se obtuvieron cDNAs parciales. Finalmente se realizó un ensayo de expresión por PCR-semicuantitativa, cuyos resultados no fueron concluyentes, pero sí podría ser útil en la estandarización de la técnica bajo las condiciones experimentales manejadas en este estudio. En conclusión, este trabajo aporta información y conocimiento sobre la inducción de genes en común en respuesta a los metales Al, Cu y Zn en *Fagopyrum esculentum*, una planta tolerante a estos metales.

#### Abstract

The contamination of soils with high concentrations of metals is a problem that has been increased by the progress of mining-metallurgical activity throughout history. In addition to this problem, the acidity of soils causes toxicity effects on susceptible plants, because at an acidic pH there is an increase in the absorption of the bioavailable forms of the metals. In plants, metal toxicity causes as main visible symptoms, inhibition in primary root growth and leaf chlorosis, however, it has been reported that some plant species are able to tolerate these conditions. Tolerance means a reduction in the absorption of metals, the activation of internal mechanisms of the plant to cope with these stress conditions (such as the response to oxidative stress) and the accumulation of metals inside the plant maintaining the homeostasis and the integrity of the cells. These mechanisms of tolerance in the plant require a coordination of physiological and biochemical processes, some of which require changes in global gene expression. However, the integration of tolerance mechanisms to generate a phenotypic response is currently under study.

*Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) is able to tolerate high concentrations of aluminum (Al) by accumulation in its leaves, and also has been reported to be tolerant to copper (Cu) and zinc (Zn). Previous studies in the laboratory with 2-day-old seedlings showed that *F. esculentum* responds generally to Al, Cu or Zn, presenting an inhibition in root growth in the first hours of exposure (0-48 h) and recovering its growth and development in a normal way to later times (72 h later). In order to know which genes are involved in the phenotypic response that is common to these three metals, a

comparative analysis of root tip transcriptomes ( $\approx 1$  cm) was performed using microarray technology exposing *F. esculentum* seedlings to metal ions Al, Cu and Zn (independently) for 24 and 48 h. It was determined that 264 genes are induced ( $z \geq 1.5$ ) in common in response to all three metals at 24 h, and only 51 genes are shared at 48 h. The functional analysis of the groups of induced genes in common with Al, Cu and Zn revealed that at 24 h there are genes that have already been reported for their role in response to different metals in various tolerant or sensitive plants. Genes such as metal transporters: *ZIP10* (*ZINC TRANSPORTER 10 PRECURSOR*), *ATMRP1* (*MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1*), *YSL1* (*YELLOW STRIPE LIKE 1*) and *MATE* (*MULTI-ANTIMICROBIAL EXTRUSION PROTEIN*); antioxidant response genes such as *TH2* (*THIOREDOXIN F2*); and genes involved in the ligation of metals into the PCS1 cytoplasm (*PHYTOCHELATIN SYNTHASE 1*); genes encoding proteins implicated in the synthesis or perception of hormones such as *ERF2* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR-2*), *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE 1*), *SAUR* (*SMALL AUXIN UPREGULATED*) type of auxin-regulated response ZEP gene (*ZEAXANTHIN EPOXIDASE*). We selected for cloning genes such as *FeYSL1* (*YELLOW STRIPE LIKE 1*), two non-allelic forms of the *FeYSL3* (*YELLOW STRIPE LIKE 3*), *FeZEP* (*ZEAXANTIN EPOXIDASE*) and *FEASA2* (*ANTHRANILATE SYNTHASE  $\alpha$ 2*). A semi-quantitative PCR assay was performed with these cloned genes, the results were not conclusive but they could be useful in the standardization of the technique under the experimental conditions handled in this study. In conclusion, this work provides information about the induction of genes in common response to metals such as Al, Cu and Zn in *Fagopyrum esculentum*, a tolerant plant.

# 1. Introducción

## 1.1 Problema de la contaminación del suelo por metales tóxicos

Los metales se encuentran naturalmente en los suelos terrestres en concentraciones que se consideran traza y que raramente superan los 1000 mg Kg<sup>-1</sup> de suelo. La concentración de los metales aumenta en sitios próximos a afloramientos o yacimientos naturales, y, principalmente por actividades humanas como la minería y la agricultura (Alloway, 2013). Esto ha generado una acumulación y, por consiguiente, la contaminación de los suelos en todo el mundo por metales como el Cd, Cu, Cr, Zn, Ni y Pb (Raymond *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2011). Según registros más de 350 sitios en el planeta se encuentran contaminados por la minería y el procesamiento de minerales. Geográficamente, los sitios se encuentran en la mayoría de los continentes y en casi 50 países. África, Europa del Este y Sudeste de Asia son las regiones más representativas en cuanto a contaminación debida a la actividad minera (BLACKSMITH INSTITUTE, 2012), pero sin duda este es un problema que afecta a todas las regiones del mundo (Reichman, 2002; Brown *et al.*, 2014).

En México<sup>1</sup>, la actividad minera se desarrolla principalmente en los estados del norte y centro del país, como son: Coahuila, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas, donde se producen

actualmente tres cuartas partes del valor total de la producción minera nacional, y como resultado de esta actividad, en estas entidades federativas se generan millones de toneladas de residuos mineros por año. Se estima que cada año se generan más de 100 millones de toneladas de residuos, principalmente en los estados de Sonora, Chihuahua y Zacatecas. La mala disposición de estos residuos ha generado un problema de contaminación en el país, representando un riesgo no sólo para la conservación de los ecosistemas, sino también para la salud de la población en el área (México, Diario Oficial de la Federación, 2009).

La preocupación por la contaminación se relaciona con el impacto ecotoxicológico que las altas concentraciones de metales pueden tener sobre los organismos del suelo, teniendo un efecto directo en la productividad de cultivos en sistemas agrícolas y en la salud humana. La dieta para la mayoría de los individuos, es la mayor fuente de exposición a los metales, debido a que los metales pueden acumularse dentro de los tejidos de las plantas, entrar a las cadenas alimenticias y mediante el consumo de vegetales, pueden causar efectos en la salud de los humanos (*i.e.* envenenamiento secundario) (Vries *et al.*, 2013). A su vez la contaminación atmosférica y de los cuerpos de agua, en sitios cercanos a mineras o lugares donde se trabaja con metales, representan fuentes de exposición significativas para los humanos en el área y pueden ocasionarle de igual forma problemas de salud por ingesta e inhalación (Tchounwou *et al.*, 2012)

---

<sup>1</sup> Actualmente en México no se tiene una base de datos que permita integrar un inventario de residuos mineros, por lo que no existe información estadística reciente acerca de su generación (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2016).

El efecto tóxico de los metales en las plantas depende de su concentración y de su disponibilidad, esta última, está influida por las propiedades del suelo tales como el pH (Groenenberg *et al.*, 2010). En suelos fuertemente ácidos ( $\text{pH} \leq 4.5$ ), los nutrientes metálicos para las plantas Zn, Cu, Fe, Mn, así como el Al un metal tóxico, se vuelven mayormente biodisponibles. El Al (el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre), se solubiliza en suelos ácidos, en su forma biodisponible como catión trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ). Se ha estimado que aproximadamente el 50% de la tierra cultivable, tiene problemas de acidez en los suelos con toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$ , y por lo tanto, hay un decremento en la productividad de los cultivos (Delhaize *et al.*, 1993).

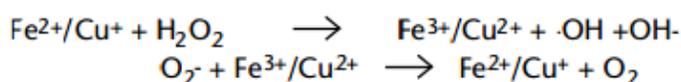
Por todo lo anterior, resulta importante el estudio de especies de plantas que sean capaces de crecer en suelos contaminados con metales en niveles tóxicos. Conocer qué plantas y los mecanismos que han desarrollado para tolerar estas condiciones, es de utilidad en la selección de especies vegetales para su aprovechamiento como cultivos, o bien, en programas de fitorremediación.

## 1.2 Toxicidad por metales en plantas

Algunos de los metales de transición son esenciales para muchos de los procesos fisiológicos de las plantas, estos elementos fueron adquiridos en el curso de la evolución debido a sus propiedades químicas, tales como su participación en reacciones de oxido-reducción en condiciones fisiológicas (Cu y Fe), o por su fuerza como ácidos de Lewis (Zn). Las propiedades de los metales de transición que los hacen indispensables para la vida, los hace fácilmente fitotóxicos cuando se encuentran presentes en exceso (Reichman, 2002). El término de fitotoxicidad se utiliza a menudo para definir el efecto negativo que los metales causan al inhibir el crecimiento de las plantas (Reichman, 2002) y depende de la concentración y disponibilidad de los metales en el suelo. Existen otros metales como el Pb, Al y Cd que no son esenciales y que son considerados únicamente como fitotóxicos.

La disminución del crecimiento y el amarillamiento de las hojas (clorosis) son síntomas visibles de la fitotoxicidad por altas concentraciones de metales. Estos síntomas son consecuencia de la alteración de diferentes procesos fisiológicos en la planta, uno de ellos es la competencia de los metales por la entrada a la raíz, ya que al encontrarse en concentraciones mayores, los metales son absorbidos preferencialmente en lugar de los nutrientes esenciales, provocando de esta manera síntomas de deficiencia de otros micronutrientes. A nivel celular, los metales redox activos pueden participar en las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (figura 1) que resultan en la formación del radical hidroxilo lo cual generará estrés oxidativo (Azpilicueta *et al.*, 2010). Los metales que no experimentan cambios en su estado de oxidación, no participan en las reacciones de Haber-Weiss y Fenton, sin embargo pueden generar de manera indirecta especies reactivas de oxígeno al poseer similitud con otros elementos, y además, por tener una gran afinidad por grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo; interfieren con diversas moléculas (especialmente proteínas, lípidos y nucleótidos) bloqueando sus grupos funcionales, modificando su conformación, o simplemente alterando su integridad. Esto, trae como principal consecuencia, la inactivación de enzimas que participan en vías metabólicas clave como la fotosíntesis y la respiración, lo que finalmente genera un desajuste en las especies reactivas de oxígeno provocando estrés oxidativo (Hodson, 2012; Hall, 2002).

### Reacción de Fenton



### Reacción de Haber-Weiss

**Figura 1. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.** En presencia de metales como el hierro o el cobre, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) puede ser convertido en la especie sumamente reactiva radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) en una reacción química catalizada por el metal, denominada reacción de Fenton. El metal oxidado puede someterse a una re-reducción en una reacción posterior con el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Un mecanismo alternativo para la formación directa de  $\cdot\text{OH}$  a partir de  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la reacción independiente de la catálisis del metal conocida como reacción de Haber-Weiss.

Un aspecto importante a considerar de la fitotoxicidad, es la presencia simultánea (mezcla) de diversos metales en altas concentraciones en los suelos, ya que cuando varios iones metálicos se presentan al mismo tiempo, interactúan produciendo una serie de efectos sinérgicos o antagónicos (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007). Existe un interés creciente en conocer qué especies vegetales y de qué manera son capaces de tolerar las condiciones del suelo en presencia de mezclas de diversos metales, esto con el objetivo de ampliar el conocimiento en el número de plantas que pueden ser candidatas para ser empleadas en cultivos en suelos contaminados (Diez-Lázaro & Diez, 2008).

### 1.3 Mecanismos de tolerancia

Durante su evolución, algunas especies de plantas fueron desarrollando mecanismos para hacer frente a las situaciones de toxicidad por metales. Estos mecanismos se pueden clasificar en dos grandes categorías: **1) restricción en la captación (mecanismos de exclusión)**, y **2) mecanismos de tolerancia interna** (Clemens *et al.*, 2001; Hossain, 2012; Lal, 2010), los cuales se describirán con más detalle dentro de esta sección.

#### 1.3.1 Restricción en la captación

La estrategia de exclusión o evasión consiste en impedir la entrada del metal por la raíz y así evitar que se distribuya dentro de la planta. Esta estrategia involucra, como principal mecanismo, la inmovilización de los iones metálicos, ya sea por su retención en la rizosfera, por la liberación de ácidos orgánicos, por la presencia de micorrizas, o bien, a través de su unión a la pared celular de las células de la epidermis de la raíz (Hossain, 2012).

### **- Retención de los metales en la rizosfera: Mecanismos de exclusión por exudación de ácidos orgánicos**

Para mantener los metales inmovilizados en la rizosfera, las plantas exudan quelatos, principalmente ácidos orgánicos, que pueden formar complejos con los metales en la rizosfera, impidiendo su entrada a la planta. Por ejemplo, se ha reportado que cuando se crecen los genotipos tolerantes de *Triticum aestivum* (Poaceae) a 200  $\mu\text{M}$  de Al, producen una alta cantidad de ácido málico en comparación con los genotipos sensibles (Delhaize *et al.*, 1993). Por otro lado, se ha demostrado que plantas de *Zea mays* (Poaceae) que crecen en elevadas concentraciones de Al (50 - 80  $\mu\text{M}$ ), aumentan su exudado de ácido cítrico y esto solo se observa en cultivares tolerantes (Pellet *et al.*, 1995). Finalmente, *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) (trigo sarraceno) es una especie tolerante que, cuando es expuesta a Al en una concentración de 150  $\mu\text{M}$ , exuda cantidades apreciables de ácido oxálico (Zheng *et al.*, 1998).

Para poder llevar a cabo el flujo extracelular de diferentes ácidos orgánicos, se han identificado diferentes transportadores de los mismos. Uno de ellos es el transportador de malato activado por aluminio ALMT (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER), que se caracterizó como una proteína de resistencia a Al, la cual actúa principalmente activando el flujo extracelular de malato al medio, en plantas de *Triticum aestivum*. La expresión heteróloga de este gen (*TaALMT*) en células de tabaco (*Nicotiana tabaccum*) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) activa la exportación de malato y mejora la resistencia al estrés por Al. En plantas transgénicas de *A. thaliana* se observa el mismo flujo extracelular de malato y mayor resistencia a la toxicidad por Al cuando se expresa el gen *TaALMT1* (Ryan *et al.*, 2010).

### **-Micorrizas**

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) son un tipo de biotrófos obligados de plantas superiores, los cuales mejoran el crecimiento y desarrollo de estas, aumentando la obtención de fosfatos, micronutrientes y agua del suelo. También se ha reportado que los HMA están presentes en las raíces

de plantas creciendo en suelos contaminados con metales, donde juegan un papel importante en la inmovilización de los metales protegiendo a la planta de estas condiciones. Las estrategias utilizadas en la inmovilización de los metales por los HMA incluyen: 1) los metales pueden depositarse en la pared celular y en vacuolas de las células fúngicas, 2) los metales pueden unirse a metalotioneinas o fitoquelatinas en el interior de las células de los HMA, 3) los hongos liberan glomalinas, un tipo de glicoproteínas insolubles que se unen a los metales y los mantienen inmóviles en la rizosfera, y 4) la adsorción de los metales a estructuras fúngicas como las hifas y vesículas (Upadhyaya *et al.*, 2010; Jan & Parray, 2016).

#### ***-Unión de los metales a la pared celular en la raíz***

En la raíz, la pared celular de las células epidérmicas y del cortex de la raíz, juega un papel importante en la inmovilización de los iones de metales ya que proporciona sitios pécticos, grupos histidil y carbohidratos extracelulares, tales como calosa y mucílago, que, a partir de la unión de los metales a estas moléculas, se evita la entrada de los metales al citosol (Manara, 2012). Sin embargo, dependiendo de la especie de planta, la pared celular puede poseer un número limitado de sitios de absorción disponibles, lo que sugiere que para algunas especies este mecanismo tiene un impacto mínimo en la tolerancia a metales. En genotipos de tabaco con características particulares en la composición de su pared celular, se observaron diferencias en la sensibilidad a la toxicidad por Mn. Por otro lado, *Silene vulgaris* ssp. *Humilis*, acumula diferentes metales en las células de la epidermis uniéndolos a proteínas o silicatos en la pared celular (Bringezu *et al.*, 1990). Estos datos sugieren que las propiedades químicas de la pared celular pueden ser moduladas para la captación de metales y consecuentemente para la tolerancia (Wang *et al.*, 1992).

### 1.3.2 Mecanismos de tolerancia interna

Algunas especies de plantas son capaces de minimizar los efectos adversos de las altas concentraciones de metales regulando su distribución y translocación a lo largo de sus órganos. Para lograr esto, las plantas emplean una serie de transportadores y actividades metabólicas en el interior de sus células, que les permiten regular la entrada de los metales a través de la raíz y el transporte hacia la parte aérea (Manara, 2012), lo cual las habilita para acumular los metales en concentraciones que la mayoría de las especies no tolerarían. A estas plantas se les conoce como acumuladoras, ya que pueden almacenar el metal de forma tal que se mantenga inactivo y sin generar daño alguno (Chaudhry *et al.*, 1998)

#### **- Transportadores de membrana**

Las plantas poseen varias familias de transportadores relacionados con la captación y la homeostasis de metales, tanto en la membrana plasmática como en el tonoplasto, estos ayudan a mantener las concentraciones de metales en niveles que la planta pueda tolerar. Dependiendo de su función, los transportadores se agrupan en dos categorías: 1) los transportadores de entrada al citoplasma y tonoplasto, y 2) los de salida de la célula (Paulose *et al.*, 2008). Dentro de los primeros encontramos a miembros de la familia ZIP (ZINC-REGULATED TRANSPORTERS), IR (IRON-REGULATED TRANSPORTERS), NRAMP (NATURAL RESISTANCE ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN), ABC (ATP-BINDING CASSETTE) y YSL (YELLOW-STRIPE-1-LIKE). Por otro lado, tenemos los transportadores para la salida de sustancias del citoplasma: CDF (CATION DIFFUSION FACILITATOR), ATPasas tipo P, la familia de transportadores del tipo ABC, entre éstos últimos se encuentran los transportadores MRP (MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN). En esta categoría, también podemos encontrar a transportadores múltiples de drogas como: MFS (MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY), SMR (SMALL MULTIDRUG RESISTANCE), RND (NODULATION-CELL DIVISION) y MATE (MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION).

Algunos de los transportadores mejor estudiados pertenecen a la familia de transportadores YSL y se ha propuesto que el mecanismo de acción de éstos transportadores es la movilización de metales como el Fe, formando complejos con la nicotianamina (Waters *et al.*, 2006). La nicotianamina (NA) es un aminoácido no proteínogénico que se encuentra en todas las plantas superiores y, se ha observado por estudios *in vitro*, que forma complejos estables con los metales: Mn, Fe, Co, Zn, Ni y Cu. Estudios realizados en levaduras expresando el gen para la proteína de síntesis de nicotianamina (nicotianamina sintasa), mostraron que la sobreexpresión de este gen es capaz de conferir resistencia a altas concentraciones de Ni (Delphine *et al.*, 2006). La nicotianamina se ha propuesto como un buen candidato para el secuestro de metales y para el transporte vía simplasto a través de la planta, debido a que está presente en brotes y raíces en concentraciones que oscilan entre 200 y 500 nmol/g de peso fresco, y en el xilema (20  $\mu$ M) y floema (130  $\mu$ M) (DiDonato *et al.*, 2004). Miembros de la familia de proteínas YSL se han descrito en diferentes especies, los cuales se expresan en diversos tejidos y se ha observado que se encuentran conservados en cuanto a su función como transportadores NA-metal (DiDonato *et al.*, 2004; Delphine *et al.*, 2006; Ryoichi *et al.*, 2011). Junto con lo anterior y otros estudios de caracterización molecular, histológica y bioquímica, se tiene evidencia sobre el posible papel de los YSL para el transporte a distancia de diferentes iones metálicos (Fe, Zn, Ni y Cu), en respuesta a las condiciones de deficiencia o exceso de metales, que dependerá de las isoformas y de la especie de planta (Wang, *et al.*, 2013).

#### ***-Inactivación de los metales en el citosol***

Los metales en el interior de las células pueden participar en reacciones que perjudican el estado redox. Por ejemplo, los metales capaces de modificar su estado de oxidación como el hierro y el cobre ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ) pueden participar en las reacciones de Haber-Weiss y Fenton que resultan en la formación del radical hidroxilo. Los metales que no experimentan cambios de óxido-reducción, como el cadmio y el plomo ( $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ ), no actúan directamente en la generación de especies reactivas de oxígeno pero

alteran el sistema de defensa antioxidante de la célula. Además, como se mencionó anteriormente, los metales pueden unirse a moléculas importantes tales como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos y afectar procesos celulares. Por lo anterior, las plantas tienen que almacenar los metales en el interior de las células empleando para ello quelantes de metales en el citosol; como ejemplo de lo anterior se puede nombrar a dos péptidos específicos: fitoquelatinas y metalotioneínas que pueden secuestrar a los metales en compartimentos subcelulares como las vacuolas. Además se han reportado un gran número de pequeñas moléculas (ácidos orgánicos, aminoácidos y derivados del fosfato) que también están involucrados en la quelación de metales en el interior de la célula (Tchounwou *et al.*, 2012).

### ***-Señalización en respuesta a los metales***

#### **Hormonas**

Las hormonas de plantas o fitoreguladores están involucradas en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo, además de que juegan un papel crucial en la adaptación de las plantas al estrés abiótico. Se ha reportado un incremento en los niveles de hormonas como el ácido abscísico, auxinas, etileno y ácido jasmónico en plantas de diferentes familias cuando son expuestas a diferentes metales (Viehweger, 2014). Por ejemplo, se ha sugerido que el etileno puede funcionar como una señal en la transducción al estrés por Cd y Cu ya que, la exposición a estos metales, estimula la síntesis de etileno por medio de la regulación de la expresión y la actividad de la ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) sintasa (Manara, 2012). Por otro lado, se ha visto que la inhibición del crecimiento de la raíz de *A. thaliana* en presencia de Al está mediada por la producción de etileno, el cual puede actuar como señal para alterar la síntesis y el transporte de auxinas (Sun *et al.*, 2010). Estos autores reportaron que la síntesis de auxinas es estimulada en presencia de etileno ya que induce la expresión de los genes *WEI2/ASA1* (WEAK ETHYLENE INSENSITIVE2/ANTHRANILATE SYNTHASE  $\alpha$ 1) y *WEI7/ASA2* (WEAK ETHYLENE INSENSITIVE7/

ANTHRANILATE SYNTHASE  $\beta$ 1) que codifican para la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima limitante en la síntesis de triptófano, intermediario en la síntesis del ácido indolacético. Además se ha reportado que, raíces de líneas mutantes de *A. thaliana* insensibles a etileno *etr1-3* y *ein2-1* y mutantes *pin2* y *aux1* (involucrados en transporte de auxinas), mostraron un fenotipo insensible al Al. Se propone que estas hormonas, puedan jugar un papel crucial en la respuesta al estrés por metales ya que están implicadas en los cambios en la morfología de la raíz (Pei *et al.*, 2009).

### **Factores de transcripción**

Se sabe poco del mecanismo por medio del cual los metales activan factores de transcripción; es decir, si la activación es específica para un metal en particular o si involucra una respuesta común a varios metales; si está relacionada con el estrés oxidativo, o bien, si está mediada por hormonas, y por último, si está conectada con la respuesta al estrés en general (Shao *et al.*, 2010). Algunos de los factores de transcripción que se han encontrado inducidos en plantas en presencia de metales son: el factor de transcripción *OBF5* (*OCS-ELEMENT BINDING FACTOR 5*) el cual se induce por presencia de Cd en plantas de *A. thaliana*. Se conoce que éste factor de transcripción es inducido por auxinas, ácido salicílico y por especies reactivas de oxígeno, y se sugiere que estas moléculas son parte de la señalización en el estrés por Cd (Shao *et al.*, 2010). En otros trabajos con *A. thaliana* en presencia de Cd, se observó un aumento en la expresión de factores de transcripción del tipo ERF (ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR) los cuales participan en la vía de transducción de señales de respuesta al etileno (Manara, 2012).

### **1.4 Respuesta de defensa común a los metales**

Existen evidencias que sugieren que las plantas comparten mecanismos comunes de respuesta a la exposición a diferentes metales (Clemens, 2001). Estudios a nivel de transcriptoma de raíces de arroz

(variedad IR-64) que fueron expuestas por 24 h de manera independiente a diferentes metales: 100  $\mu\text{M}$  de As(V), Cd, Cr(VI) ó Pb, mostraron grupos de genes compartidos que participan en la defensa de esta planta a estos iones metálicos (Dubey *et al.*, 2014). Por otro lado, el análisis de transcriptomas de raíces de *A. thaliana* (variedad Col-4) expuestas de manera independiente por 24 h a  $\text{AlCl}_3$  (25  $\mu\text{M}$ ), NaCl (50 mM),  $\text{CdCl}_2$  (15  $\mu\text{M}$ ) ó  $\text{CuSO}_4$  (1.6  $\mu\text{M}$ ), mostraron que existe una respuesta de inducción o activación de genes en común a la exposición con estas rizotoxinas. En éste estudio se reportaron genes inducidos que codifican para las enzimas glutatión S transferasas, peroxidasas, proteínas de unión a calcio (Ca) y enzimas para la síntesis de la trehalosa (Zhao *et al.*, 2008).

El rápido avance en la genómica ha generado una gran cantidad de datos que permiten tener una mayor comprensión de las respuestas al estrés abiótico en varios sistemas de plantas. Actualmente, se estudia las respuestas de las plantas a diferentes tipos de a nivel fisiológico y molecular.

### 1.5 Modelo de estudio: *Fagopyrum esculentum* Moench var. Mancan

*Fagopyrum esculentum* (de aquí en adelante *Fagopyrum*) es una dicotiledónea perteneciente a la familia de las Polygonaceas y al orden Caryophyllales. Es una planta anual de periodo de crecimiento corto (30-45 días), presenta un crecimiento indeterminado con una floración de 5 a 6 semanas posterior a la siembra, y tiene un ciclo de vida de 80 a 90 días. *Fagopyrum* requiere polinización cruzada para producir semillas, por lo que los insectos polinizadores son esenciales para la efectiva fertilización y producción de las mismas (Agri-Facts, 2001). Esta planta es capaz de crecer en suelos deficientes en nutrientes y prefiere un clima fresco, húmedo y un suelo arenoso bien drenado para crecer de manera óptima (Ratan & Preeti, 2011). Además, *Fagopyrum* es una planta que requiere de un largo periodo de oscuridad (de noche larga o de día corto) para crecer adecuadamente. Esta planta sólo forma flores cuando la duración del día es menor de 12 h (Campbell, 1997).

*Fagopyrum* se conoce comunmente como trigo sarraceno o alforfón y fue uno de los primeros cultivos en ser domesticados en Asia. Este cultivo se extendió a través de Asia a Europa y fue traído a las colonias americanas en el siglo XVII d. C. (Myers & Meinke, 1994). Su primer uso como alimento es probable que se haya dado en China hace 5,000 a 6,000 años.

*Fagopyrum* no es un cereal, pero las semillas (en sentido estricto aquenios) suelen clasificarse como granos de cereal debido a su uso similar. El grano se utiliza generalmente como alimento humano y animal: para la alimentación de aves de corral y como harina para la preparación de galletas, fideos, cereales y cerveza. La proteína de trigo sarraceno es de excelente calidad y es alta en el aminoácido esencial lisina (que no se encuentra en los cereales comunes). Además, es un cultivo multipropósito ya que las pequeñas hojas y los brotes se utilizan para la extracción de rutina que es un metabolito secundario utilizado en medicina, y también se puede aprovechar para producir miel de muy buena calidad. *Fagopyrum*, se considera un cultivo de importancia secundaria en muchos países, sin embargo, ha persistido a lo largo de siglos de la civilización y se utiliza en casi todos los países donde se cultivan cereales. Los principales productores son China, Rusia, Ucrania y Kazajstán (Campbell, 1997).

*Fagopyrum esculentum* Moench, variedad Mancan, fue desarrollada en 1974 para suplir la demanda de trigo sarraceno de semilla grande para el mercado de exportación. Es un trigo sarraceno o alforfón de tipo japonés de mitad de temporada que se desarrolló en la Estación de Investigación de Agricultura en Canadá, Morden Manitoba. Su atributo principal es que sus semillas son de tamaño grande, lo que se traduce en un fácil descascarado y un mayor porcentaje de producto de molino, en comparación con el alforfón de semilla de tamaño pequeño (Campbell, 1997).

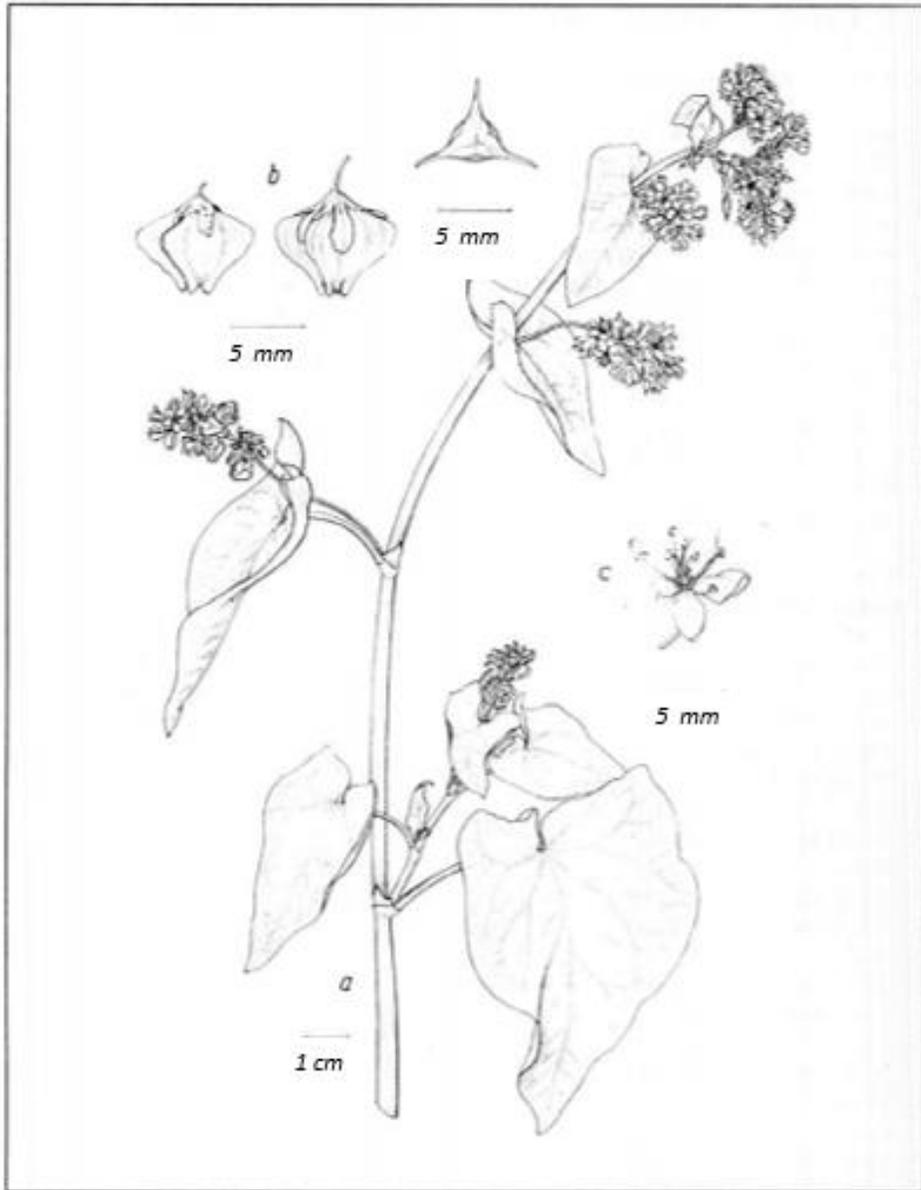


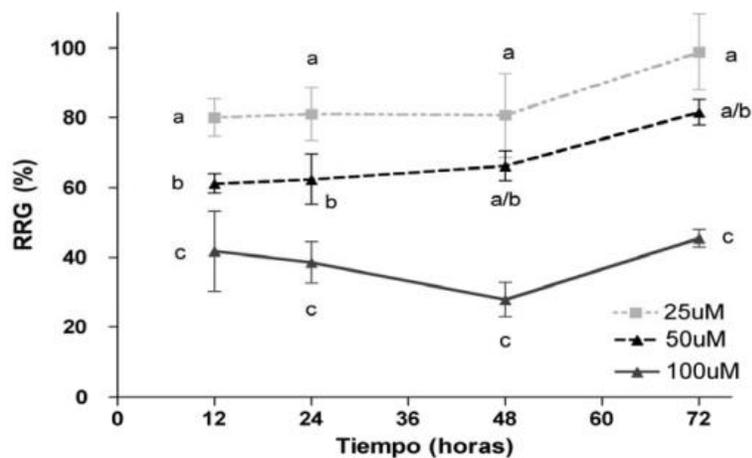
Figura 2. *Fagopyrum esculentum* Moench : a) brote floral; b) fruto y c) flor (tomada de Campbell, 1997).

#### 1.4.1 Tolerancia de *Fagopyrum esculentum* a los metales

*Fagopyrum* es conocida como una especie acumuladora de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ), por estudios realizados con la variedad Jianxi (Shen *et al.*, 2002) se sabe que el ácido oxálico está involucrado en esta especie, tanto en la desintoxicación interna como externa. Con respecto a la desintoxicación externa se ha visto que, cuando ésta planta se expone a  $\text{Al}^{3+}$ , el oxalato es rápidamente liberado de las puntas de las raíces. Tras la captación, el  $\text{Al}^{3+}$  puede quelarse con el oxalato en la raíz, formando un compuesto no fitotóxico estable: Al-oxalato (Horbowicz *et al.*, 2011). Cuando el  $\text{Al}^{3+}$  se transloca desde las raíces, *F. esculentum* llega a acumular  $> 400 \text{ mg Al kg}^{-1}$  de peso seco en sus hojas (Zheng *et al.*, 1998). Sorprendentemente el trigo sarraceno no acumula aluminio en las semillas. Este hecho resulta importante debido al potencial del trigo sarraceno para ser empleado como cultivo en suelos ácidos con  $\text{Al}^{3+}$  disponible (Horbowicz *et al.*, 2011). Además, *Fagopyrum* también es conocida por ser acumuladora de Cu y Zn y es capaz de tolerar altas concentraciones de estos metales. Tani y Barrington (2005), expusieron a *Fagopyrum* a concentraciones de Cu (0, 5, 10 y 15 mg/L) y Zn (0 y 25 mg/L) por arriba de los niveles normales encontrados en aguas tratadas y observaron que esta planta puede acumular estos metales en sus hojas.

Recientemente, y después de haber realizado los microarreglos de la presente tesis, se realizó un estudio a nivel transcripcional (RNA-Seq), de la respuesta de *Fagopyrum esculentum* Moench. de la variedad asiática cv Jianxi a la exposición por 24 h de una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (en hojas y raíces de plántulas de 3 días de edad). En este estudio se observó un aumento en la expresión de 4,067 genes en las raíces y 2,663 en las hojas. Dentro de los genes de alta expresión se encontraron a *STOP1/ART1* (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1/AL RESISTANCE TRANSCRIPTION FACTOR1*), *ALS3* (*ALUMINUM SENSITIVE3*), *ALS1* (*ALUMINUM SENSITIVE1*), *MATE1* y *MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION1*, homólogos a los genes de *Oryza sativa* y *A. thaliana* (Yokosho *et al.*, 2014).

Además de estos reportes, en estudios previos en el laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología (UNAM), plántulas de 48 h de germinación de *F. esculentum* var. Mancan se crecieron en medio hidropónico en presencia de  $\text{AlCl}_3$ , en el análisis de crecimiento relativo de la raíz (RRG), las plántulas presentaron una inhibición inicial del crecimiento de la raíz en las primeras horas del tratamiento (0-48 h), mostrando una recuperación hacia las 72 h. En la figura 3 se observa que a partir de las 12 h, la planta sometida a cualquiera de las concentraciones de  $\text{AlCl}_3$ , muestra una inhibición en RRG, siendo mayor la inhibición en las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . A las 72 h de exposición, se observa que la planta recupera su crecimiento radicular relativo (RRG) en alrededor de un 100% y 80% con respecto al control para las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{M}$  Al, respectivamente (Reyna-Llorens, *et al.*, 2015). Aunque las plántulas expuestas a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  continuaron presentando una inhibición, a las 72 h se observa que su crecimiento empieza a recuperarse.



**Figura 3. Tasa relativa de crecimiento de la raíz (RRG %) de *F. esculentum* a diferentes concentraciones de Al.** En la gráfica se muestra un promedio de 3 ensayos independientes (n=20), las barras de error denotan el error estándar del ensayo. Las letras muestran diferencias significativas de acuerdo al ANOVA (tomada de Reyna-Llorens, *et al.*, 2015).

De igual forma, experimentos realizados con plantas de *F. esculentum* expuestas a Al durante su ciclo de vida completo (plántulas hasta la floración), mostraron una inhibición temprana en el crecimiento de la raíz. Sin embargo, a tiempos de exposición posteriores a las 72 h, aún con la concentración a la que la planta presenta una mayor inhibición del crecimiento de la raíz (100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ), se observó una recuperación en el crecimiento de toda la planta, lo cual se manifestó al término de su ciclo de vida (Martínez-Rendón, 2013). Para complementar estos resultados, se realizaron experimentos a nivel fisiológico (determinación del crecimiento relativo y de la tasa fotosintética), ambos parámetros no presentaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos con Al (con respecto al control). Resultados similares se encontraron al exponer plántulas de *F. esculentum* a diversas concentraciones de Cu y Zn (durante las primeras 72 h de tratamiento y durante su ciclo de vida completo). De estos trabajos se observó que las concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  de Al, 0.75  $\mu\text{M}$  Cu y 2.5  $\mu\text{M}$  Zn tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz a las primeras 24 h de exposición, con una disminución en la RRG% alrededor de un 35-40% (Cruz-Ortega, R. comunicación personal). Sin embargo, éste efecto inhibitorio no fue severo y permitió a la planta responder durante las horas siguientes. Estas evidencias podrían sugerir la existencia de una respuesta de tolerancia común a la exposición a los iones metálicos Al, Cu y Zn a las 24 h, en la que la planta requiere un tiempo de aclimatación para contrarrestar los efectos tóxicos de los iones y de esta manera poder desarrollarse de manera normal. Con base en los antecedentes mencionados, y con un análisis de microarreglos heterólogo, realizado anteriormente, el interés del presente trabajo fue el de analizar los resultados del microarreglo para conocer cómo la planta de *F. esculentum* podría estar respondiendo al estrés ocasionado por Al, Cu y Zn, y conocer la existencia de genes en común en respuesta a estos tres metales.

## 2. Hipótesis

El efecto similar que los metales causan en raíces de *Fagopyrum esculentum* es consecuencia de la inducción de la expresión de genes en común

## 3. Objetivo general

Evaluar la respuesta de *Fagopyrum esculentum* a través de la expresión génica, a los metales aluminio, cobre y zinc.

### 3.1 Objetivos particulares:

Analizar los datos de microarreglos de plántulas de *F. esculentum* (2 días de edad) expuestas a los metales Al, Cu y Zn por 24 y 48 h.

Seleccionar, a partir de los resultados del análisis de los microarreglos, algunos de los genes compartidos en respuesta a los metales Al, Cu y Zn a las 24 h de tratamiento, clonar y obtener la secuencia de estos genes en *F. esculentum*.

Evaluar la expresión por PCR semicuantitativa de los genes seleccionados a diferentes tiempos de exposición de los metales.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Material vegetal

Todos los experimentos se realizaron con semillas de *Fagopyrum esculentum* var. Mancan, obtenidas de *Wildlife Management Solutions, Inc. Eutaw, Alberta, Canadá*.

### 4.2 Ensayo de microarreglos

La obtención de tejido vegetal para el análisis de transcriptomas por microarreglos se obtuvo de germinar semillas de *F. esculentum* sobre agar al 1% en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Las cajas con las semillas se colocaron en una cámara de crecimiento (Labline Instruments, Inc. USA) a 26° C en la oscuridad. 48 h después de germinadas, las plántulas se sumergieron en una solución de CaCl<sub>2</sub> a 0.5 mM, pH 4.5 durante una hora, para su aclimatación en medio ácido. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas en recipientes de 500 mL y se trataron durante 24 y 48 h con las siguientes condiciones: la primera condición consistió en agregar una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM a pH 4.5 con 50 µM de AlCl<sub>3</sub>. Para la segunda condición se adicionó solución de CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM a pH 4.5 con 0.75 µM de CuSO<sub>4</sub>. Para la tercera condición se agregó solución de CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM a pH 4.5 con 2.5 µM de ZnSO<sub>4</sub>. Finalmente, la cuarta condición consistió en exponer las plántulas a CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM pH 4.5 en ausencia de metales, ésta se designó como condición control. En estas soluciones no se añadió ningún otro nutrimento ya que estos podrían interactuar con los iones metálicos disueltos y disminuir su actividad. Estas concentraciones fueron seleccionadas con base en experimentos previos de curvas dosis respuesta, en donde la exposición a estas concentraciones causó una disminución apreciable en el crecimiento de la raíz a las 24 h, pero sin causar un efecto severo, y en horas posteriores se observó una recuperación (Cruz-Ortega, R. comunicación personal).

Para este ensayo se empleó el método de hibridación competitiva por microarreglo heterólogo. Este método emplea como sonda de hibridación-base el genoma de una planta modelo, en este caso *Arabidopsis thaliana* con el fin de estudiar el transcriptoma de *F. esculentum* (cuyo genoma no había sido secuenciado en ese momento (2013), ni el RNA seq se había realizado (Yokosho et al., 2014), siendo liberado el genoma hasta el 2015). La impresión de los arreglos consistió en fijar las sondas específicas para cada gen en particular sobre un sustrato, en este caso laminillas de vidrio recubiertas con epóxico. Tanto la impresión de los arreglos, la preparación de la sonda, la hibridación de las matrices, así como la lectura de las intensidades para cada punto de la matriz de genes hibridados, se realizó en el servicio de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, empleando para ello 10 µg de un “pool” de RNA total extraído de aproximadamente 60 plantas tratadas.

#### 4.2.1 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total, se seccionaron las puntas de la raíz ( $\approx 1$  cm) de las plántulas bajo las cuatro condiciones mencionadas en la sección anterior. Las puntas de la raíz fueron sumergidas de inmediato en nitrógeno líquido y almacenadas en tubos eppendorf a  $-80$  °C hasta el momento de su uso. Posteriormente se realizó la extracción de RNA total del tejido colectado con el kit de aislamiento de RNA (MOBIO) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La concentración y medición de la pureza del RNA total se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000. Se verificó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 2% con formaldehído y bromuro de etidio para su visualización. Los geles se expusieron a luz ultravioleta en el equipo BioDoc-It Imagen System.

#### 4.2.2 Preparación de la sonda y la hibridación de arrays.

El RNA total extraído se utilizó en la síntesis de cDNA y se le incorporaron los nucleótidos marcados dUTP-Alexa555 (GREEN) para la condición control y dUTP-Alexa647 (RED) para la condición de estudio. La incorporación del fluoróforo se analizó mediante la medición de la absorbancia a 555 nm para Alexa555 y 655 nm para Alexa 647. La lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000. A continuación se mezclaron en cantidades iguales ambos cDNA marcados y se incubaron juntos para la hibridación con su cDNA complementario inmovilizado en la matriz del microarreglo. Cuanto mayor sea la hibridación de una sonda correspondiente con un punto en la matriz, indica una mayor expresión de mensajero.

#### 4.2.3 Adquisición de datos y análisis de las imágenes de la matriz

La adquisición y cuantificación del conjunto de imágenes se realizó en un lector para microarreglos GenPix 4100A. Para cada punto de la matriz se obtuvo el valor de intensidad de las señales del fluoróforo Alexa555 y Alexa655, así como el valor de fondo, usando el software ArrayPro Analyzer de Media Cybernetics.

#### 4.2.4 Análisis de los datos de microarreglos

Del ensayo de microarreglos se obtuvieron dos imágenes de intensidad de puntos en la matriz, una de las imágenes corresponde a la señal para el fluoróforo Alexa555 que se empleó para marcar la condición control, la segunda imagen corresponde a la señal del fluoróforo Alexa647 que se usó para marcar la condición de estudio.

Los resultados de la lectura de las imágenes de los arreglos se expresaron como datos de intensidad para cada punto correspondiente a un gen específico. Las intensidades se analizaron empleando el software

libre GenArise, desarrollado en la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). Este software lleva a cabo una serie de transformaciones como son la corrección de fondo, la normalización de los datos, la filtración de datos de intensidad y la selección de genes expresados diferencialmente. El objetivo del software GenArise es identificar los genes que muestran una buena evidencia de ser expresados diferencialmente. Para esto, el software identifica entre dos imágenes de intensidad sobrelapadas (condición 1 VS condición 2) la expresión diferencial de genes mediante el cálculo del valor  $z$ , que indica el número de desviaciones estándar de un punto de intensidad con respecto a la media aritmética de la vecindad de puntos, empleando la siguiente fórmula:

$$z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$$

Donde  $z_i$  es el valor de  $z$  correspondiente a cada elemento,  $R_i$  es la relación logarítmica entre las señales de intensidad de los fluoróforos para cada elemento, y  $\text{sd}(R)$  es la desviación estándar de la variable  $R$  de los puntos de intensidad.

De esta manera los puntos que muestran un valor  $z \geq \pm 1.5$ , representan los genes que se expresan diferencialmente, ya sean de alta o baja expresión según sea el caso.

Para la identificación de los grupos de genes de alta expresión en respuesta específica para cada metal y de respuesta común para los tres metales, se realizaron diagramas de Venn usando la herramienta bioinformática <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>. Posteriormente, los genes se analizaron y clasificaron empleando los servidores online Classification SuperViewer ([http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools\\_classification\\_superviewer](http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer)).

### 4.3 Selección de genes para el aislamiento y clonación de la secuencia parcial

El criterio de selección de los genes para su posterior clonación, fue con base en un análisis exhaustivo en la literatura sobre la relación de los genes de alta expresión con la respuesta al estrés por metales; a partir de éste análisis se seleccionaron cuatro genes: 1) el gen *AtMRP1* (*ARABIDOPSIS THALIANA MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN*), 2) el gen que codifica el transportador de complejos *METAL-NICOTINAMINA* similar al locus *yellow stripe* de maíz (*ARABIDOPSIS THALIANA YELLOW STRIPE LIKE 1, ATYSL1*), 3) el gen *ATERF-2* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR- 2*), y ) el gen *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE ALPHA SUBUNIT 1 ASA1*) que codifica la subunidad alfa 1 de la enzima anthranilato sintasa la cual participa en la síntesis de auxinas. Estos genes resultaron interesantes debido a que se tienen reportes de estar implicados en la respuesta a la presencia de metales y a otros factores de estrés abiótico.

### 4.4 Aislamiento, clonación y secuenciación de fragmentos de los genes seleccionados

#### 4.4.1 Diseño de oligonucléotidos degenerados

De acuerdo con la matriz de hibridación de *A. thaliana* empleada en el microarreglo, los genes seleccionados para su clonación corresponden con los números de accesión en la base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource) que se muestran en la tabla 1:

**Tabla 1. Genes seleccionados y número de accesión o ID en TAIR**

Gen	Número de Accesión en TAIR
<i>ANTRANILATO SINTASA ALFA SUBUNIDAD 1, (ASA1)</i>	At5g05730
<i>ATYSL1, PROTEÍNA TIPO YELLOW STRIPE 1, (YSL1)</i>	At4g24120
<i>FACTOR DE RESPUESTA A ETILENO 2, (ERF2)</i>	At5g47220
<i>ARABIDOPSIS THALIANA ATP-BINDING CASSETTE C1, Proteína asociada a la Resistencia a múltiples drogas (MRP1)</i>	At1g30400

En el diseño, uno de los oligonucleótidos (iniciador reverso o iniciador hacia delante) se generó a partir de la secuencia de oligonucleótidos establecida inicialmente por la librería empleada en el ensayo de microarreglos (*A. thaliana*). El segundo oligonucleótido (iniciador reverso o iniciador hacia delante) se diseñó con base en las regiones conservadas tanto en la secuencia de proteína como en las secuencias nucleótídicas de diferentes especies de plantas, después de hacer alineamientos usando el servidor CLUSTALOMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las regiones seleccionadas se degeneraron en los puntos con cambios de bases nucleotídicas, usando los nucleótidos con mayor presencia entre las especies analizadas. La tabla 2 muestra los cebadores diseñados para cada gen, la nomenclatura para los transcritos se designó empleando las abreviaturas correspondientes para los genes en TAIR (Tabla 1) anteceditas de las letras *Fe*, que refieren a la planta *Fagopyrum esculentum*.

**Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR.**

Transcrito	Secuencia	Tamaño esperado del producto (pb)	Programa de PCR
<b>FeASA1</b>	F-5' GCAGGAGACATATTTTCAGATCG 3' R-5' ACWGGYAAWGC <del>M</del> GCACGYAG5 3'	563	Un ciclo de desnaturalización inicial (90°C por 3 min); 30 ciclos de 3 pasos (90°C por 30s para la desnaturalización, 55°C por 30 s para la hibridación, y 70°C por 30s para la extensión) y un ciclo final de extensión (70°C por 10 min).
<b>FeYSL1</b>	F-5' <del>AC</del> YGCKGTTCTCATYAATGG 3' R-5' TGCCGTAGTTATAAGCCATGTT3'	753	
<b>FeERF2</b>	F-5' AGAGG <del>R</del> GTGAG <del>R</del> CAGAG <del>R</del> C3' R-5' ACACTTCACCTGCACCCACCTC3'	336	
<b>FeMRP1</b>	F-5' <del>C</del> RAGTY <del>R</del> GCTGAGAATA 3' R- 5' CGTTTGCAGTTCCTGTAC 3'	849	

\* las letras en rojo indican las bases degeneradas.

#### 4.4.2 Diseño de oligonucleótidos específicos.

Con el fin de optimizar la amplificación de genes en *F. esculentum* y con base en la secuencias de los fragmentos del gen potencial *FeYSL1*<sup>2</sup>, que había sido posible obtener por secuenciación hasta el momento en nuestro laboratorio, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 3).

---

<sup>2</sup> Este gen finalmente resultó ser el *FeYSL3* como se menciona más adelante.

**Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR.**

Transcrito	Secuencia	Tamaño esperado del producto (pb)	Programa de PCR
<i>FeYSL3</i>	F1-5'TATGTTGGAGCTGGAATGATAT3' R1-5'AAGCAATCCAACCGGAATA3'	375	Un ciclo de desnaturalización inicial (90°C por 3 min); 28 ciclos de 3 pasos (90°C por 30s para la desnaturalización, 60°C por 30s para la hibridación, y 70°C por 30s para la extensión); y de un ciclo final de extensión (70°C por 10 min).
	F1-5'TATGTTGGAGCTGGAATGATAT3' R2-5'ATATTCTTTTCCTTCAACATGGCAT3'	272	
	F2-5'ACTGCTGTTCTCATCAATGG3' R3-5'GCCGTAGTTGTAAGCCATGTT3'	745	

Se logró la amplificación del fragmento de 745 pb del gen *FeYSL3* usando los oligos anteriores, y a partir de la secuencia obtenida se procedió nuevamente a desarrollar otros oligos específicos únicamente para el gen *FeYSL3* (Tabla 4).

**Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR.**

Transcrito	Secuencia	Tamaño esperado del producto (pb)	Programa de PCR
<i>FeYSL3</i>	F1-5' TACTTTTGGATTGCAGGCTTGG A 3' R1-5'TAACCATTGAGACTTTTCATACTGCT3'	210	Un ciclo de desnaturalización inicial (90°C por 3 min); 28 ciclos de 3 pasos (90° C por 30s para la desnaturalización, 60° C por 30s para la hibridación, y 70°C por 30s para la extensión); y de un ciclo final de extensión (70° C por 10 min).

Así mismo, se procedió a emplear una última estrategia para el diseño de oligonucleótidos para los genes *YSL1* y *ASA1*. Además, se añadió un gen a la lista para su caracterización, el *ABA1* o *ZEP* (id: **AT5G67030**), este gen se encuentra dentro del grupo de genes de alta expresión que se identificaron en el

microarreglo y los cuales son compartidos en respuesta a los metales a las 24 h. El gen *ABA1* codifica para la proteína zeaxantin epoxidasa, la cual participa en la primer etapa de síntesis de ácido abscísico, hormona que está relacionada comúnmente con el estrés hídrico en plantas. Para la estrategia del diseño de oligonucleótidos, se realizaron alineamientos de las secuencias reportadas de los genes de *A. thaliana*, de *F. tartaricum* y de otras especies de plantas. Del alineamiento se seleccionaron las regiones conservadas en secuencia nucleotídica y se sometieron a un segundo alineamiento con secuencias procedentes de un ensayo de RNA-seq de raíces de *F. esculentum*, el cual se encuentra disponible con el número de accesoión DRX007657 en NCBI-SRA. Con éste último alineamiento, se fueron obteniendo fragmentos cortos (100 pb) de secuencia, los cuales fueron ensamblados de manera manual a fin de obtener alrededor de 500 pb ensambladas. A partir de estas secuencias se diseñaron diversos juegos de oligonucleótidos específicos: 1) para la amplificación de fragmentos largos, y 2) para la amplificación de fragmentos cortos, los cuales fueron empleados para las pruebas de expresión por PCR semicuantitativa (Tabla 5).

**Tabla 5. Secuencias de los oligonucléotidos y condiciones para la reacción de amplificación por PCR.**

Transcrito	Secuencia	Tamaño esperado del producto (pb)	Programa de PCR
<b>FeYSL1</b>	F1-5'AAGGATATGAGAGACTCCGACGA 3' R1-5'ACACCAGCTAACTCATAAGTCTTCTT 3'	395	Un ciclo de desnaturalización inicial (90°C por 3 min); 28 ciclos de 3 pasos (90°C por 30s para la desnaturalización, 60°C por 30s para la hibridación, y 70°C por 30s para la extensión); y un ciclo final de extensión (70°C por 10 min).
	F1-5'AAGGATATGAGAGACTCCGACGA 3' R2-5'GAATAGATAAGAAGTCATCCAACCAACA 3'	465	
	F1-5'AAGGATATGAGAGACTCCGACGA 3' R3-5'AGTAGCCATTCCACTTGGGTATG 3'	561	
	F2-5'ATGGACCGAGCAGATCACGTTA 3' R1-5'ACACCAGCTAACTCATAAGTCTTCTT 3'	321	
	F2-5'ATGGACCGAGCAGATCACGTTA 3' R2-5'GAATAGATAAGAAGTCATCCAACCAACA 3'	391	
	F2-5'ATGGACCGAGCAGATCACGTTA 3' R3-5'AGTAGCCATTCCACTTGGGTATG 3'	487	
	F3-5'AAGAAGACTTATGAGTTAGCTGGTGT 3 R3-5'AGTAGCCATTCCACTTGGGTATG 3'	189	
<b>FeASA1</b>	F1-5'CAGATCGTGCTGAGTCAACGT 3' R1-5'ACAGGCAATGCAGCTCGCAA 3'	461	
	F1-5'CAGATCGTGCTGAGTCAACGT 3' R2-5'AGAGTACCGCTCGATGTTTCATCA 3'	375	
	F2-5'TGAAATCCTCACCCGTGTGAAGA 3' R1-5'ACAGGCAATGCAGCTCGCAA 3'	321	
	F2-5'TGAAATCCTCACCCGTGTGAAGA 3' R2-5'AGAGTACCGCTCGATGTTTCATCA 3'	235	
<b>FeZEP</b>	F1-5'TGTCCATGCTATGCAGCCAAACAT 3' R1-5'AGGGCATAGTCATCTTCAAACCA 3'	619	
	F1-5'TGTCCATGCTATGCAGCCAAACAT 3' R3-5'GCATGCTTTCCGAAACCTGA 3'	643	
	F2-5'TTCACGGAATGGCAAGAATGGCA 3' R1-5'AGGGCATAGTCATCTTCAAACCA 3'	274	
	F2-5'TTCACGGAATGGCAAGAATGGCA 3' R2-5'AACCTGAGGATAAGGCAGCACGA 3'	440	
	F2-5'TTCACGGAATGGCAAGAATGGCA 3' R3-5'GCATGCTTTCCGAAACCTGA 3'	445	

#### **4.4.3 Amplificación**

Para la obtención de los fragmentos de los genes deseados se empleó la reacción en cadena de la DNA polimerasa, empleando para ello la enzima Taq-Polimerasa recombinante (Invitrogen) y los oligonucleótidos diseñados para cada secuencia. Para la amplificación se aisló RNA total de muestras de raíces de plántulas de *F. esculentum* expuestas durante 24 h a 50  $\mu$ M de Al (concentración que se empleó en el microarreglo). La extracción de RNA total se realizó empleando el kit de aislamiento de RNA (Zymo Research) y la concentración y medición de la pureza del RNA total se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm empleando el equipo UV-Vis NanoDrop 2000. Posteriormente se verificó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 2% con formaldehído y bromuro de etidio para su visualización. Se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción correspondiente para cada muestra usando 1  $\mu$ g de RNA, la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) y el oligo-dT (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones determinadas por el proveedor. Finalmente, se llevó a cabo la reacción de amplificación de los genes de interés y un control positivo de reacción con el gen de referencia actina 7, cuyos oligonucleótidos: F-5'CTGCCATGTATGTTGCCATC3' y R-5'CAGCTTCCATTCCGATCATT 3' generan un producto de amplificación de 400 pb (Reyna-Llorens *et al.*, 2015). Empleando la enzima Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen) y como templado el cDNA obtenido, se amplificaron los fragmentos de secuencia que posteriormente fueron evaluados por corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1 X (Tris-Acetato-EDTA), usando bromuro de etidio para su visualización.

#### **4.4.4 Purificación de productos positivos**

Los productos positivos de la amplificación por PCR se purificaron directamente de la mezcla de reacción usando el kit de extracción ILUSTRA GFX PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare). Realizada la purificación se evaluó la calidad del producto, para esto las muestras purificadas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se separaron por medio de un aparato electroforético (Enduro

Horizontal Electrophoresis Systems 7X7 cm). Después de la corrida, se observaron las bandas del tamaño esperado y el producto de PCR purificado se envió para su secuenciación al laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **4.4.5 Clonación**

Los productos de PCR purificados, se ligaron a un vector de clonación por medio del sistema pGEM-t Easy (Promega). Posteriormente se llevó a cabo la transformación de células competentes de la línea *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por medio de choque térmico. Después de la transformación, las células se sembraron en cajas de Petri con medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG y las cajas se colocaron en un horno a 37°C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se procedió a seleccionar las colonias transformadas. Las colonias color blanco (transformadas) se colectaron (de manera individual) y cada una se sembró en tubos con 5 ml de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Los tubos se colocaron en un horno rotatorio en la oscuridad y a una temperatura de 37°C por 16 h. Después se llevó a cabo la extracción del plásmido de las células por medio de lisis alcalina. Con la finalidad de corroborar que el plásmido tuviera el producto de PCR, se tomó una alícuota del mismo y se digirió con la enzima de restricción EcoRI (SIGMA) durante toda la noche a 37°C. El plásmido digerido con la enzima de restricción se cargó en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) y se separó por medio de un sistema de electroforesis (HORIZON 11-14, Life Technologies). Aquellos vectores en los que se observó la banda correspondiente con el inserto se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud del Instituto de Biología de la UNAM. A partir de esta secuencia se realizó un BLAST para determinar la similitud de estos genes con sus homólogos en *A. thaliana* y otras especies.

## 4.5 Análisis semicuantitativo de la expresión de genes

### 4.5.1 PCR Semi-cuantitativa

El estudio del patrón de expresión de los genes se realizó por PCR semicuantitativa usando los oligonucleótidos específicos de las tablas 4 y 5 (Sección 4.4.2). La semicuantificación se realizó mediante la lectura de bandas de los productos de PCR del gen de interés y un gen de referencia. En esta técnica se empleó como gen de referencia: la actina 7, cuyos oligonucleótidos (F-5´CTGCCATGTATGTTGCCATC3´ y R-5´CAGCTTCCATTCCGATCATT 3´) generan un producto de amplificación de 400 pb (Reyna-Llorens, 2015).

#### 4.5.1.1 Obtención de RNA.

Se aisló RNA total de puntas de raíz ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* expuestas por 0, 6, 12, 24 y 48 h, de manera independiente, a los tratamientos de 50  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , 0.75  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 2.5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  y un tratamiento control en ausencia de metales. La extracción de RNA total se realizó empleando el método en el apartado 4.2.1.

#### 4.5.1.2 Obtención de cDNA.

Se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción correspondiente para cada muestra usando 1  $\mu\text{g}$  de RNA, la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) y el oligo-dT (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones determinadas por el proveedor. Para verificar la calidad del cDNA y su concentración, se amplificó el gen actina 7 en todas las muestras.

#### 4.5.1.3 Amplificación por PCR.

Finalmente se llevó a cabo la reacción de amplificación de los genes de interés, empleando la enzima Taq Polimerasa (KAPPA LONG RANGE) y como templado el cDNA obtenido de una única réplica biológica. Para determinar la cantidad de ciclos a realizar para cada gen se tuvo en cuenta evitar llegar a la fase “plateau” y así poder visualizar diferencias de expresión entre las distintas muestras (Ver Anexo, Figura 1A). Una vez obtenidos los productos de PCR se corrieron 4 µL en geles de agarosa al 1% con TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) como amortiguador y bromuro de etidio para su visualización.

Para el análisis de las bandas se utilizó el software Photoshop. Con este software es posible realizar la medición de la intensidad de cada banda en el gel expresada como la densidad integrada (DI). Se midió en primer lugar la DI de las bandas correspondientes al gen de referencia. Seguido de esto, se midió la DI de las bandas correspondientes con el gen de interés para, posteriormente, determinar el cociente entre la DI de la banda de estudio, con la DI de la banda de referencia para cada muestra. Estos resultados se reportaron como la expresión relativa normalizada (ERN) de cada gen.

Para conocer el valor de cambio (fold change) en la expresión de los genes entre los tratamientos con metales y la condición control, se estableció la siguiente relación:

$$\text{Valor de cambio} = \frac{ERN_{control}}{ERN_{metal}}$$

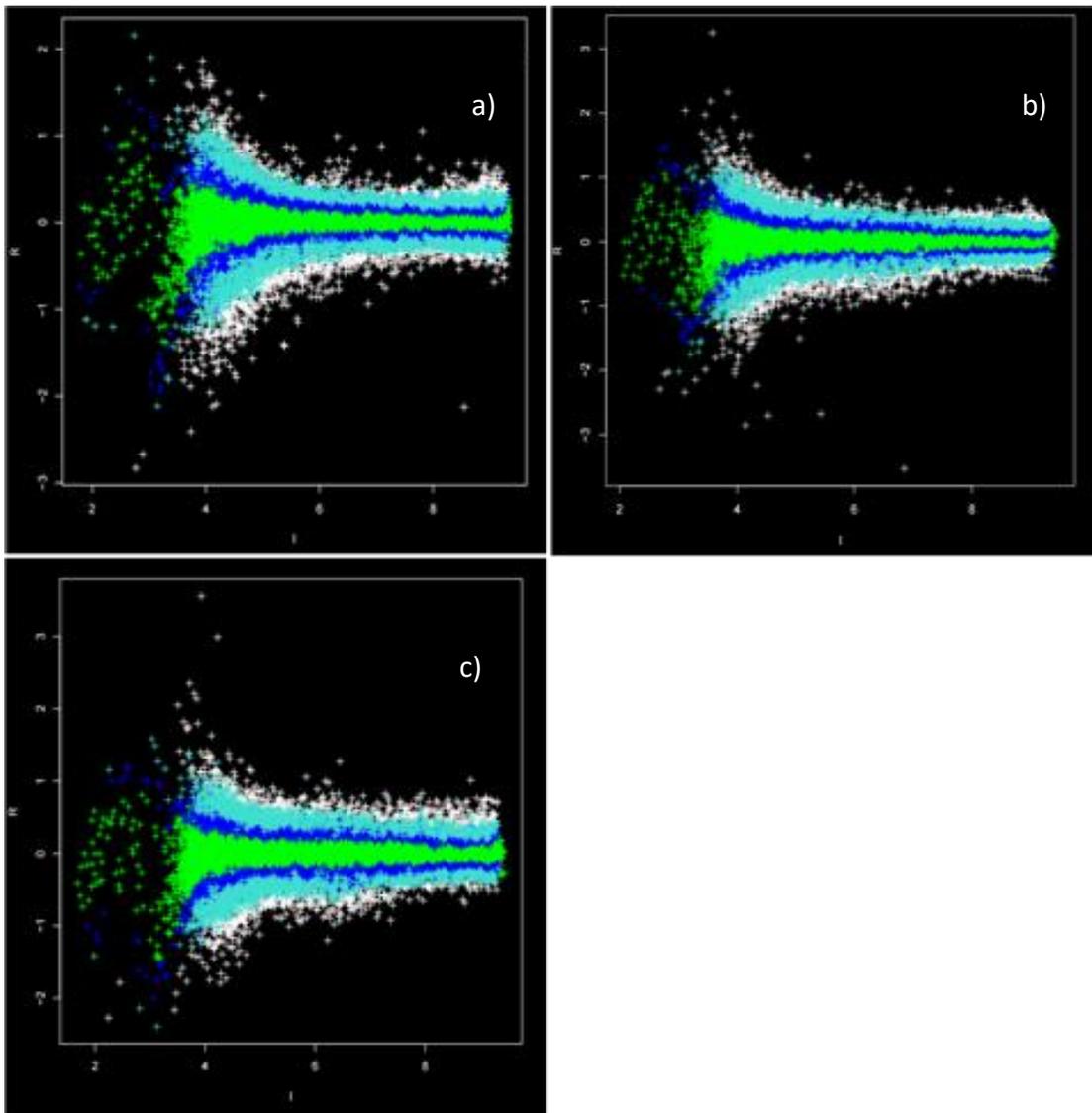
## 5. Resultados y Discusión

### 5.1 Análisis de datos de los microarreglos.

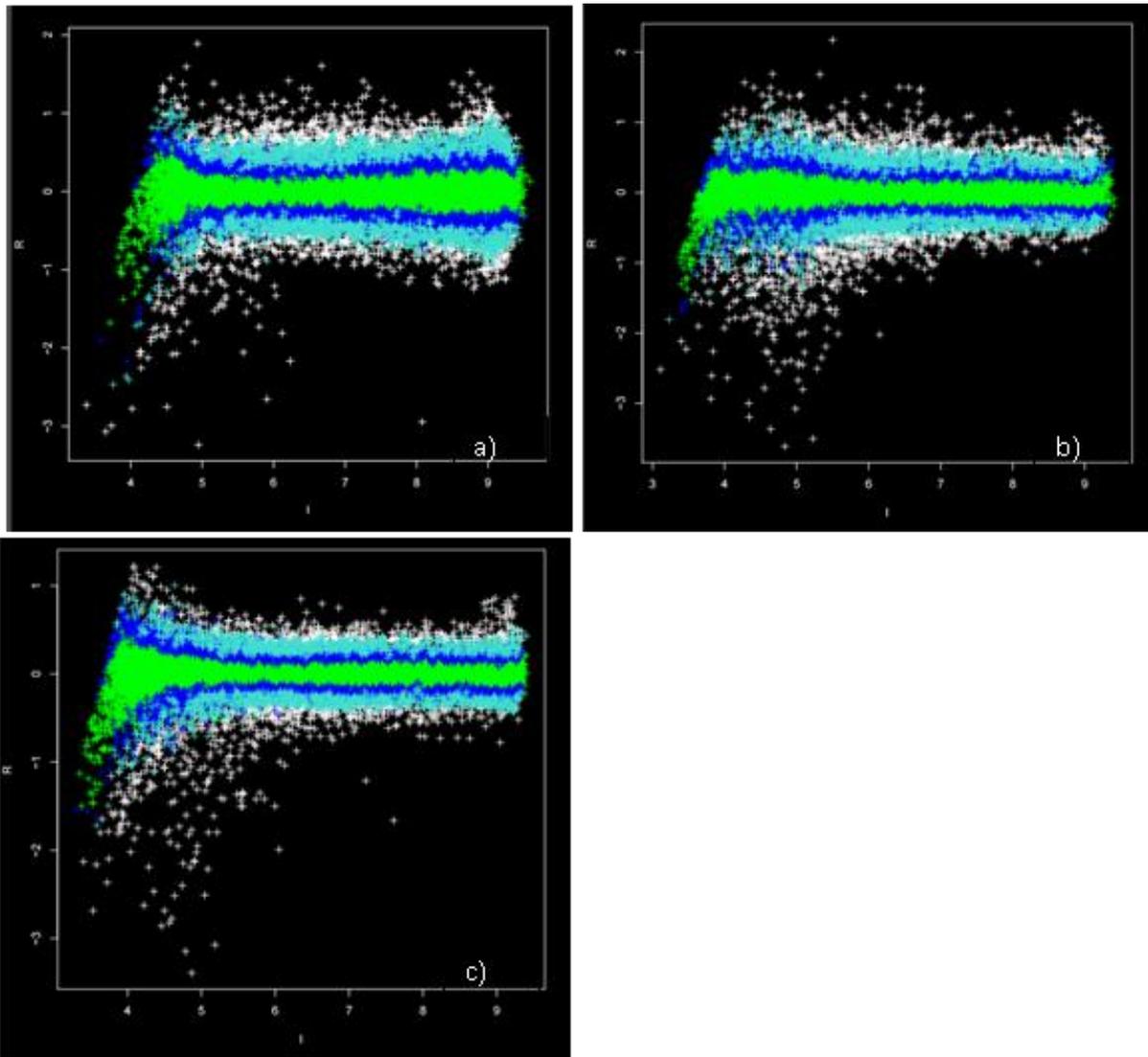
#### 5.1.1 Identificación de los genes de respuesta común a los metales Al, Cu y Zn a las 24 y 48 h de tratamiento.

En el momento en que se inició este trabajo (2013), el genoma de *F. esculentum* no había sido secuenciado. Por lo anterior, se procedió a realizar un análisis del transcriptoma a partir de ensayos de microarreglos heterólogos (con un Chip de *A. thaliana*). El microarreglo empleado analizó 30,000 genes correspondientes al genoma completo de *A. thaliana*. Los genes de alta expresión fueron clasificados en cada condición como el grupo de genes para los que hubo una variación estadística ( $z \geq 1.5$ ) significativa con respecto a su expresión con la condición control.

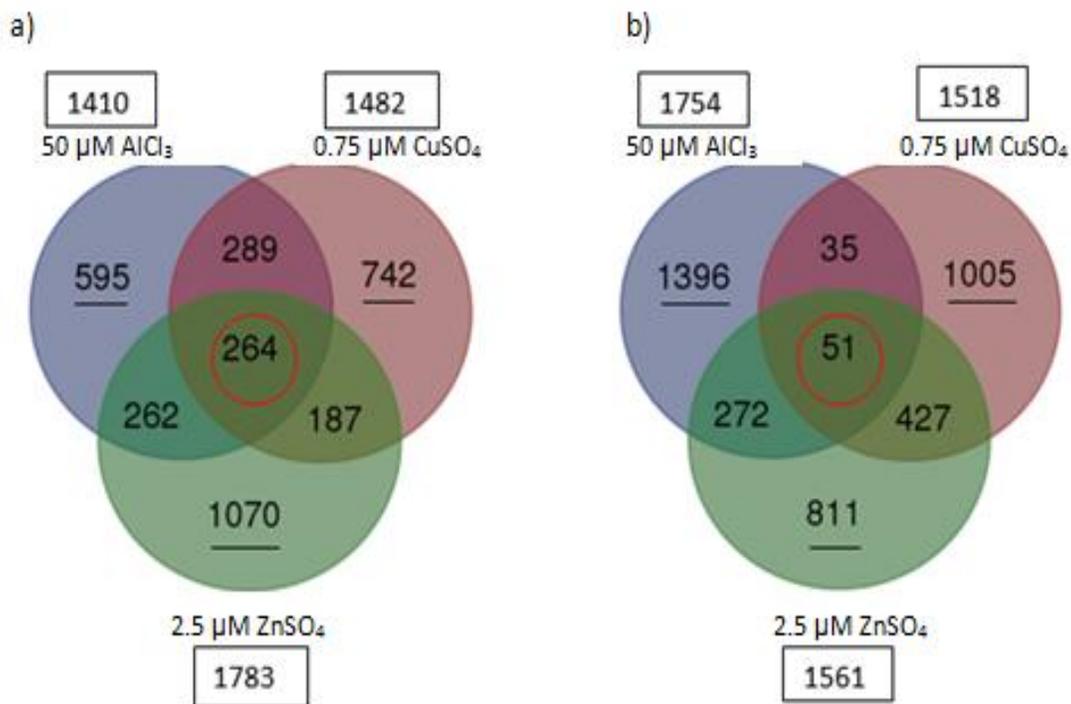
En las gráficas de la figura 4 y 5, los grupos de genes de alta expresión (valor de  $z \geq 1.5$ ) corresponden a los puntos entre el color azul agua y el blanco. Usando este procedimiento, a las 24 h de exposición, **1410** genes tuvieron una alta expresión para la condición con **Al**; **1482** genes para **Cu**; y **1783** genes para **Zn**. Mientras que a las 48 h de exposición a los metales Al, Cu y Zn se tuvieron **1754**, **1518** y **1561** genes de alta expresión respectivamente. Estos datos se compararon para conocer cuales genes se expresan en común tanto para Al, Cu y Zn a las 24 y a las 48 h. Se encontró que **264** genes se sobre expresan en común a las 24 h (figura 6 a en círculo rojo) y solo **51** genes a las 48 h (figura 6 b en círculo rojo). Por otro lado, el número de genes únicos en respuesta a cada metal varió de condición a condición, teniendo **595**, **742** y **1070** genes de alta expresión en respuesta al Al, Cu y Zn a las 24 h de tratamiento (figura 6 a, números subrayados). A las 48 h de exposición, **1396** genes se sobre expresaron con Al, **1005** con el Cu y **811** con el Zn (figura 6 b, números subrayados).



**Figura 4. Gráficas de dispersión de datos de microarreglos por hibridación competitiva, usando muestras de raíces de *F. esculentum*.** Las plántulas (2 días de edad) de *F. esculentum* se crecieron en medio hidropónico en soluciones a pH 4.5 con: **a)** 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ; **b)** 0.75  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ ; y **c)** 2.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ . Después de 24 h, se extrajo el RNA total de las puntas de la raíz ( $\approx 1$  cm) para el análisis de microarreglos. Los ejes X y Y en las gráficas indican: I es el promedio de la intensidad entre las señales RED y GREEN y su valor se calcula empleando la fórmula  $\frac{1}{2} \log_{10} \left( \frac{\text{RED}}{\text{GREEN}} \right)$  para cada elemento, y R es el coeficiente multiplicado por el  $\log_{10}$  entre las señales RED y GREEN para cada elemento. En colores se representa los valores de z para cada elemento, con color verde aquellos datos cuyo valor de z es  $\geq 0 < 1$ , azul  $\geq 1 < 1.5$ , azul aqua  $\geq 1.5 < 2$  y blanco  $\geq 2$ .



**Figura 5. Gráficas de dispersión de datos de microarreglos por hibridación competitiva, usando muestras de raíces de *F. esculentum*.** Las plántulas (2 días de edad) de *F. esculentum* se crecieron en medio hidropónico con soluciones a pH 4.5 con: **a)** 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ; **b)** 0.75  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ ; y **c)** 2.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ . Después de 48 h, se extrajo el RNA total de las puntas de la raíz ( $\approx 1$  cm) para el análisis de microarreglos. Los ejes X y Y en las gráficas indican: I es el promedio de la intensidad entre las señales RED y GREEN y su valor se calcula empleando la fórmula  $\frac{1}{2} \log_{10} \left( \frac{\text{RED}}{\text{GREEN}} \right)$  para cada elemento, y R es el coeficiente multiplicado por el  $\log_{10}$  entre las señales RED y GREEN para cada elemento. En colores se representa los valores de z para cada elemento, con color verde aquellos datos cuyo valor de z es  $\geq 0 < 1$ , azul  $\geq 1 < 1.5$ , azul aqua  $\geq 1.5 < 2$  y blanco  $\geq 2$ .



**Figura 6. Diagramas de Venn: Número de genes de alta expresión ( $z\text{-score} \geq 1.5$ ) de respuesta única para cada metal y de respuesta común para los metales Al, Cu y Zn. a) Durante 24 h y b) 48 h de exposición. Los números dentro del recuadro señalan el número de genes de alta expresión para cada condición. Los números que se encuentran subrayados representan los genes de respuesta específica para cada metal y los números dentro del círculo rojo indican los genes de respuesta común a los tres metales.**

El número de genes de defensa a cualquiera de los metales se redujo de **264** genes (ver en Anexo tabla A1) a las 24 h, a **51** genes a las 48 h (ver en Anexo, tabla A2). Lo anterior podría significar que la respuesta a los metales a 24 h de tratamiento es más general, mientras que a las 48 h de exposición se vuelve más específica.

Al comparar el grupo de 264 genes de respuesta común a las 24 h, con el grupo de 51 genes de respuesta común a las 48 h, únicamente se conservan tres genes inducidos en ambos grupos.

### 5.1.2 Características de los genes de alta expresión en respuesta común a los metales a las 24 h de tratamiento.

Los 264 genes que se identificaron como genes de alta expresión en respuesta común a los metales Al, Cu y Zn a las 24 h (figura 6 A), se agruparon dentro de categorías funcionales a través de un análisis por ontologías de MapMan empleando el servidor online "*Classification SuperViewer Tool*" y se determinó el porcentaje de genes involucrados en cada categoría (figura 7). A diferencia del análisis por GO (Gene Ontology), el cual fue diseñado para caracterizar los sistemas microbianos, el análisis por MapMan fue diseñado específicamente para las rutas y procesos de plantas (Klie & Nikoloski, 2012), es por eso que se empleó esta herramienta en el presente trabajo.

La figura 7 señala en un gráfico de pastel, en orden de mayor a menor, el porcentaje de genes dentro de las diversas categorías funcionales. Se puede observar un porcentaje mayor de genes (desde un 35 a 3 %) dentro de las siguientes categorías funcionales: sin asignación, metabolismo de proteínas, metabolismo del RNA, señalización, genes implicados en varias funciones, transporte, procesos de la célula, desarrollo, estrés y metabolismo de hormonas. Las demás categorías poseen un porcentaje de genes entre un 2 a 0.4 %.

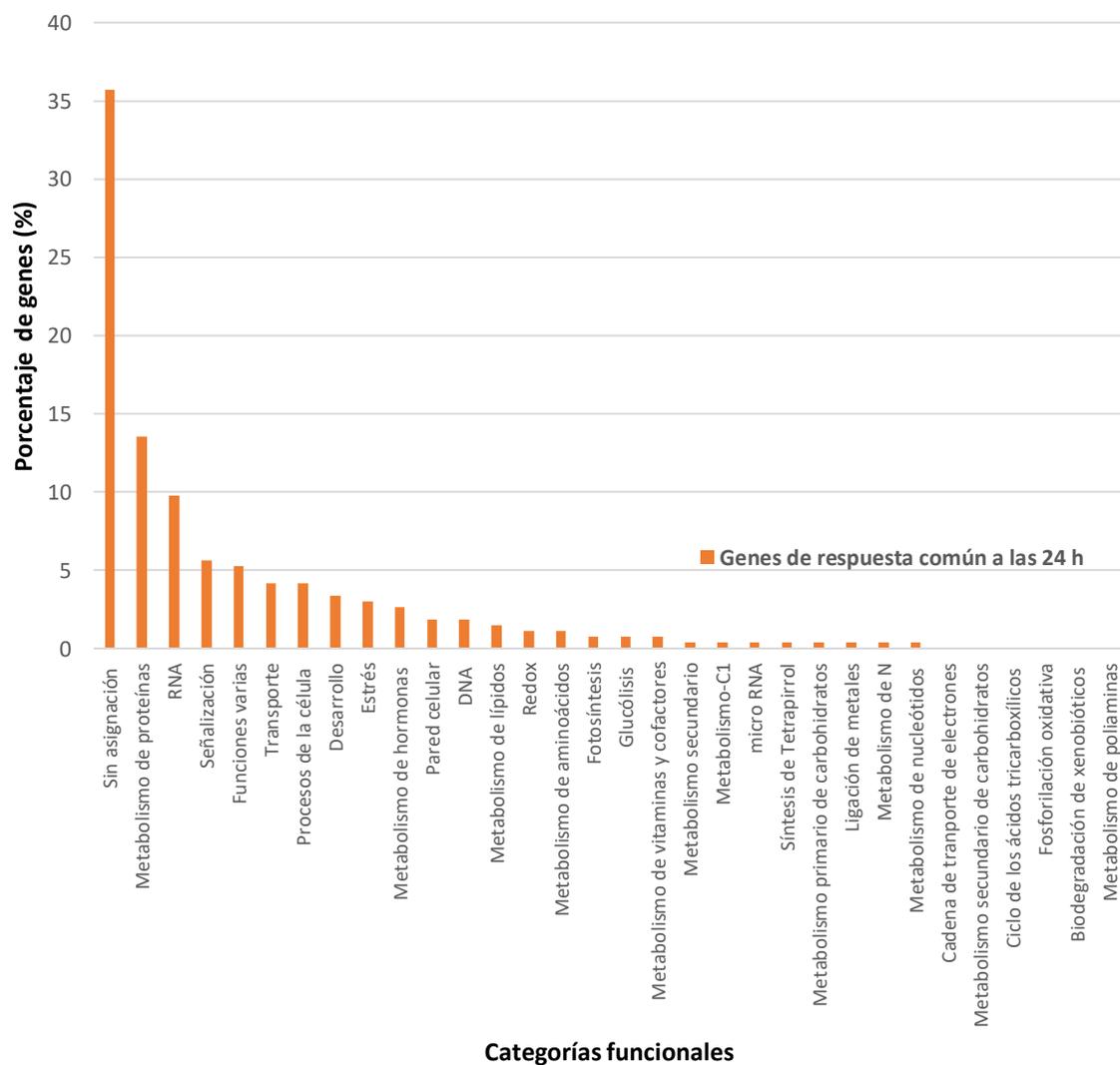
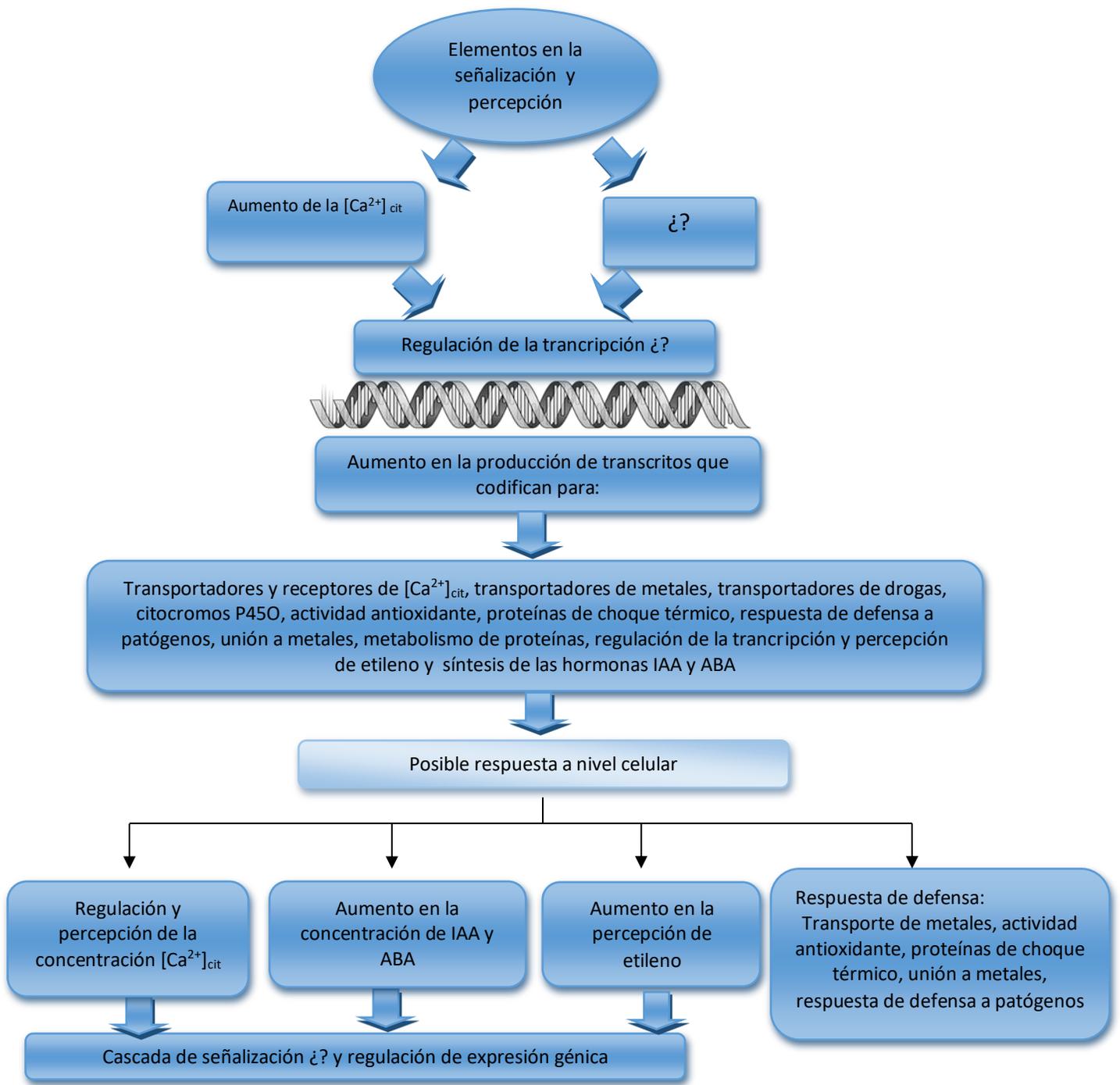


Figura 7. Distribución por porcentajes de los grupos de genes de alta expresión (en respuesta común a los metales a las 24 h) en categorías funcionales por ontologías de MapMan.

En el diagrama de la figura 8 se resume la información recabada del análisis funcional de los 264 transcritos inducidos en común al tratamiento con metales en *Fagopyrum*, y además se integra y sugiere cómo esta respuesta transcripcional puede llevar a una posible respuesta celular en la planta, para contrarrestar el estrés ocasionado. En un primer plano, podemos observar en la figura 8 la función de percepción y señalización con la cual comienza la respuesta al estrés. Del análisis realizado se encontró que, de las diversas categorías funcionales en que se clasificaron los genes de respuesta compartida a los metales, existe un porcentaje alto de genes relacionados con la “señalización” (figura 7), los cuales están involucrados en las vías de señalización por calcio, genes tales como: el gen *At5g53010*, que codifica para una ATPasa (no especificada) del tipo IIB, los genes *At3g52870* y *At2g44310* que codifican para proteínas (no especificadas) de unión a calmodulina, el gen *At2g44310* que codifica para una proteína de unión a calcio y un gen que codifica para una proteína cinasa dependiente de calcio la CPK6 (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 6). Se conoce que la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta en células vegetales, actuando el  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero durante la señalización de las plantas a diferentes tipos de estímulos (Tuteja, 2009). La inducción de genes implicados en la señalización por Ca, podría sugerir que en puntas de raíces de *Fagopyrum*, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan por la exposición al Al, Cu y Zn a las 24 h, y como consecuencia se requiere la producción de transcritos que regulen la percepción y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Siguiendo el diagrama de la figura 8, posterior a la respuesta de percepción y señalización debe ocurrir una respuesta de regulación transcripcional la cual es desconocida, y con esto aumenta la producción de transcritos que según el análisis funcional codifican para proteínas como transportadores y receptores de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  (de los que ya se habló en el párrafo anterior), transportadores de metales y otros tipos de transportadores, de los cuales se tiene a los genes que codifican para: transportadores regulados por Zn y Fe *ZIP1 (ZINC TRANSPORTER 1 PRECURSOR)* y *ZIP10 (ZINC TRANSPORTER 10 PRECURSOR)*, el transportador *YSL1 (YELLOW STRIPE LIKE 1)* miembro de los transportadores de oligopéptidos YSL, encargados del transporte de complejos metal-nicotianamina; el transportador de fitoquelatina-metal

*MRP1 (MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1)* y dos genes clasificados dentro del grupo de transportadores de drogas del tipo *MATE (MULTI-ANTIMICROBIAL EXTRUSION PROTEIN)* que están implicados en el transporte de salida de sustancias tóxicas en la célula (Manara, 2012; Kretschmar *et al.*, 2011). La inducción de genes que codifican para transportadores en respuesta a los metales Al, Cu y Zn en *F. esculentum*, sugiere que estos transportadores son importantes en la movilización y almacenamiento de los metales en la planta.



**Figura 8.** Diagrama integrativo de la respuesta a nivel transcripcional y celular de *F. esculentum* en común a los metales Al, Cu y Zn a las 24 h de tratamiento.

Del análisis funcional de los transcritos que se observaron inducidos en respuesta al tratamiento con metales en *Fagopyrum*, dentro de la categoría de estrés, se tienen genes que corresponden con la respuesta al estrés biótico y abiótico, entre ellos se encuentra un gen que codifica para una proteína de la familia de las defensinas, un gen que codifica para una proteína del tipo MATE y dos genes que codifican para proteínas de choque térmico DNAJ. En la respuesta antioxidante se encontró un gen que codifica para la tiorredoxina TF2 (THIOREDOXIN F2). También se encontró un gen cuya función entra en la categoría de unión a metales y corresponde a la PCS1 (PHYTOCHELATIN SYNTASE 1), esta enzima es importante para la producción de fitoquelatinas y la ligación de los metales en el citoplasma (Merlos *et al.*, 2016). También se encontraron genes que codifican para proteínas de la familia del citocromo P450: el gen *CYP71B17* (CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 17). En trabajos realizados por otros autores, se ha descrito la inducción de la expresión de genes que codifican para citocromos P450 durante la defensa de las plantas a diversos estímulos como son la exposición a ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno, metales pesados, estrés por luz UV, por paraquat y por la inoculación con patógenos (Narusaka *et al.*, 2004). Los citocromos se conocen por estar implicados en procesos de oxidación-reducción para la síntesis de metabolitos secundarios como esteroides, fenilpropanoides, terpenoides, fitoalexinas, brasinoesteroides y giberelinas. Sin embargo, se sabe poco acerca de las funciones de estas proteínas en la tolerancia al estrés por metales (Narusaka *et al.*, 2004).

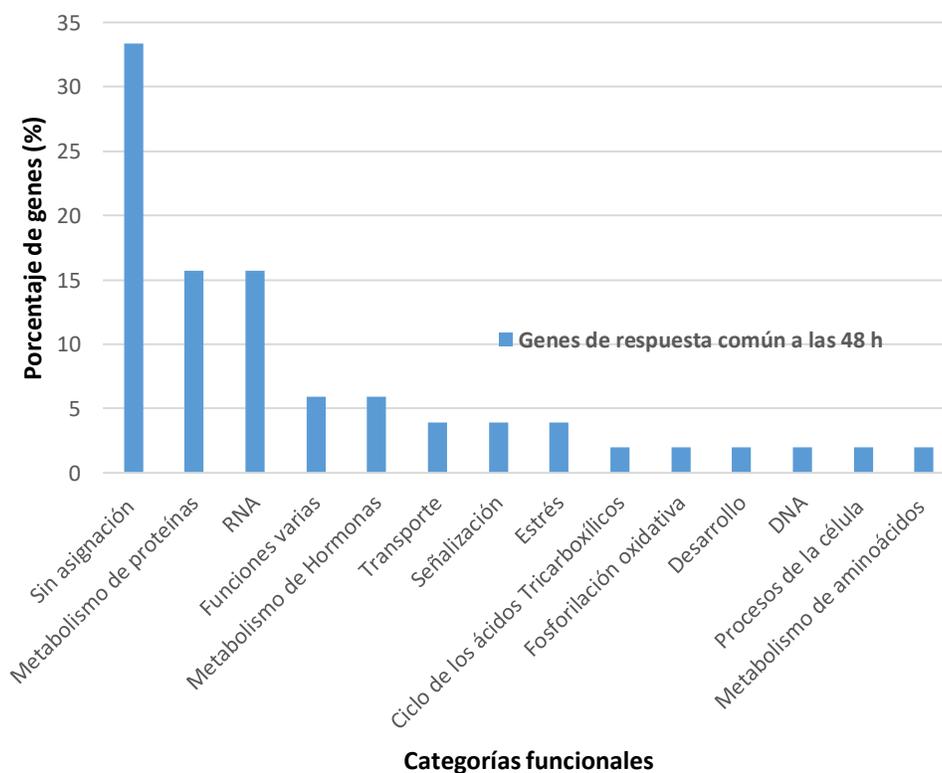
Finalmente, se encontraron genes importantes dentro de la categoría de hormonas, de estos se tiene un gen implicado en la transducción de la señal por etileno *ERF2* (ETHYLENE RESPONSE FACTOR-2). Este resultado es comparable con el encontrado por los investigadores Herbette y colaboradores (2006), en el que se observó la inducción del gen *ERF2* (*At5g47220*) en la respuesta temprana (2 h) a la administración de 50  $\mu$ M de Cd, en raíces de *A. thaliana*. Se conoce poco acerca de la regulación de la transcripción de genes por el EFR2 en presencia de metales. Sin embargo, nuestros resultados apoyan la idea del papel del etileno como parte de las moléculas de señalización que son inducidas durante el estrés por metales, debido al aumento del transcrito del gen *ERF2* en presencia de Al, Cu y Zn. En el

presente trabajo, además se encontró al gen *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE 1*) gen codifica para la subunidad  $\alpha$  de la enzima limitante en la síntesis de Trp intermediario en la síntesis del ácido indolacético (IAA), además de tres genes del tipo SAUR (*SMALL AUXIN UPREGULATED*) de respuesta regulada por auxinas. Existe una serie de reportes que señalan que el principal síntoma de la exposición de las plantas a concentraciones tóxicas de metales, es la inhibición en el crecimiento de la raíz primaria y el incremento en la formación de raíces laterales. Se ha relacionado este fenotipo con el incremento en los niveles de auxinas y etileno así como en su percepción debido a la exposición a metales como el Al. En trabajos con *A. thaliana* se observó que, al exponer raíces a 50  $\mu\text{M}$  de Al, disminuye el crecimiento de la raíz apical y aumenta la concentración de auxinas en el ápice de la raíz, lo cual podía evitarse al administrar inhibidores en la síntesis de etileno y antagonistas en la percepción de la señal de esta hormona (Kopittke, 2016). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, podrían sugerir que existe una relación entre la síntesis y percepción de auxinas y etileno, con el fenotipo de inhibición del crecimiento de la raíz de *Fagopyrum* encontrado a las 24 h de exposición a los metales Al, Cu y Zn.

Por otro lado, en un trabajo anterior realizado por Reyna-Llorens y colaboradores (2015) con plántulas de *Fagopyrum*, se observó un incremento del 33 % en la concentración endógena de ácido abscísico, en raíces tratadas durante 48 h con 50  $\mu\text{M}$  de Al. En el presente estudio se encontraron dos genes inducidos en común al tratamiento con metales en *Fagopyrum*, genes que participan en los procesos de síntesis del ácido abscísico; estos son el gen *ZEP* (*ZEAXANTHIN EPOXIDASE*) y *HVA22G* (*HVA22-LIKE PROTEIN H*). Con estos datos podría sugerirse la existencia de un aumento en los transcritos que codifican para proteínas de la síntesis de ácido abscísico, lo cual podría tener como resultado la acumulación de esta hormona a las 48 h de exposición a los metales (op. cit).

### 5.1.3 Características de los genes de alta expresión en respuesta común a los metales a las 48 h de tratamiento

En el análisis comparativo de microarreglos de raíces de plántulas de *Fagopyrum* se identificó un grupo de **51 genes** de alta expresión en respuesta común a los metales Al, Cu y Zn a las 48 h de tratamiento (figura 6 B). Esto quiere decir, que este grupo de genes es inducido por cualquiera de las tres condiciones. Los 51 genes se clasificaron en categorías funcionales usando el análisis de ontologías de MapMan empleando el servidor online Classification SuperViewer Tool y se determinó el porcentaje de genes involucrados en cada categoría. A continuación se describe el resultado de este análisis (figura 9).



**Figura 9. Distribución por porcentajes de los grupos de genes de alta expresión (en respuesta común a los metales a las 48 h) en categorías funcionales por ontologías de MapMan.**

Al igual que el grupo de genes de respuesta común a las 24 h, el grupo de genes compartidos a las 48 h, posee un porcentaje mayor de genes (33 %) dentro de la categoría “sin asignación”, seguido de un 15 % en la categoría del metabolismo de RNA y un 15 % en la categoría del metabolismo de proteínas. Las categorías implicadas en el metabolismo de hormonas, funciones varias, transportadores, señalización y estrés, representan un 23 % del total de genes inducidos, las demás categorías representan un 11 % (figura 9).

El diagrama de la figura 10 muestra un resumen acerca de la información funcional recopilada de los genes inducidos en común por metales a las 48 h en raíces de *Fagopyrum*. En la parte superior del diagrama se describe a la función de señalización, la cual, junto con la regulación de la transcripción son procesos que se desconocen. Posterior a estos procesos, en el diagrama se describe la inducción de transcritos que codifican para proteínas implicadas en la síntesis de las hormonas citocininas, ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS); proteínas para la percepción de brasinoesteroides, proteínas de transporte, señalización y estrés. En este trabajo se encontró el gen *IPT1* (*ISOPENTENYLTRANSFERASE 1*), que codifica para la enzima limitante en la vía de síntesis de citocininas y el gen *AT4G36470.1*, una metil-transferasa dependiente de S-adenosil metionina, la cual está asociada con la función de síntesis de ácido salicílico y jasmónico. Comparando estos resultados con la literatura, existen reportes en los cuales se ha observado que el aumento en la concentración endógena de citocininas, AJ y AS disminuyen la elongación de la raíz primaria y pueden contribuir con el desarrollo de raíces laterales durante las etapas tempranas de exposición a estas hormonas. En un trabajo realizado con *A. thaliana*, la aplicación exógena de citocininas disminuyó la elongación de la raíz primaria, mientras que la reducción en la concentración endógena de citocininas incrementó la elongación (Smet *et al.*, 2015). Así también se reportó en el trabajo realizado por Pasternak y colaboradores (2005), que el tratamiento de raíces de *A. thaliana* con AS durante 7 días, disminuía el crecimiento de la raíz primaria, aceleraba la formación de raíces laterales y de pelos radiculares cercanos a la punta de la raíz, cuyo fenotipo es similar al obtenido al exponer las raíces de *A. thaliana* a CuSO<sub>4</sub>. De igual forma, la aplicación de metil jasmonato a las 48 h

en plántulas de *A. thaliana*, generó la disminución en el crecimiento de la raíz primaria y la aparición de raíces laterales (Raya-González *et al.*, 2012). Por todo lo anterior, de nuestro trabajo, con *Fagopyrum*, podríamos relacionar y sugerir la inducción a las 48 h de los genes *IPT1* (asociado con la síntesis de citocininas) y el gen *AT4G36470.1* (asociado a la síntesis de AS y AJ) durante los tratamientos con los metales Al, Cu y Zn, con la producción de hormonas citocininas, AS y AJ, y con la inhibición del crecimiento de la raíz que se observa a las 24 h y 48 h de tratamiento con estos metales.

En la percepción de brasinoesteroides se encontró un gen (*At1g74360*), el cual codifica para un receptor del tipo cinasa rico en leucina (LRR RLK) (no especificado). De la literatura, se sabe que los brasinoesteroides son percibidos por los receptores LRR RLK, estas hormonas se unen a un subdominio de las repeticiones de leucina, iniciando de este modo la traducción de la señal intracelular a través de la activación de una cascada de cinasas por la autofosforilación de este receptor y culminando en la expresión de genes (O'Brien & Benková, 2013).

En la categoría de genes respectivos a la señalización, se encontraron únicamente dos genes que participan como receptores del tipo cinasa, el gen *At5g62710* que codifica para una proteína del tipo cinasa rica en leucina no especificada y el gen *PDLP6* (*PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 6*). Se ha propuesto el papel de las proteínas PDLP como receptores de las señales en los plasmodesmos debido a que poseen una estructura similar a los receptores tipo cinasa, que son inducidos en respuesta a patógenos, generando señales como especies reactivas de oxígeno y ácido salicílico. Además, podrían participar en la modulación del tráfico de sustancias de célula a célula como son las hormonas (Thomas *et al.*, 2008), lo que podría correlacionar con la inducción de genes en la función relacionada con las hormonas que se describió en el párrafo anterior.

En los transcritos que codifican para proteínas de transporte se encontró un solo gen relacionado con el transporte de metales, el gen *NRAMP4* (*NATURAL RESISTANCE ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 4*).

Los transportadores NRAMP se conocen por expresarse en la raíz y están involucrados en el transporte de metales a través de la membrana plasmática y del tonoplasto (DalCorso *et al.*, 2013). El transportador ATRAMP4 está relacionado con el transporte de los metales Cd, Mn y Fe hacia la vacuola en las células de hoja (Lanquar *et al.*, 2005; Lanquar *et al.*, 2010). El gen *NRAMP4* podría estar involucrado en el transporte de los metales Al, Cu y Zn en las células de la raíz de *Fagopyrum*.

En la categoría de genes relacionados con el estrés abiótico se tienen dos genes, el gen *COR78* (*COLD REGULATED 78*) o *RD29A* (*RESPONSIVE TO DESICCATION 29A*) y el gen *CHS3* (*CHILLING SENSITIVE 3*), ambos codifican para proteínas de defensa y tolerancia al estrés por congelación.

Finalmente a partir del análisis comparativo entre los grupos de genes en común a las 24 y 48 h, únicamente se observa que se conservan inducidos **tres genes, los cuales tienen función desconocida**.

}

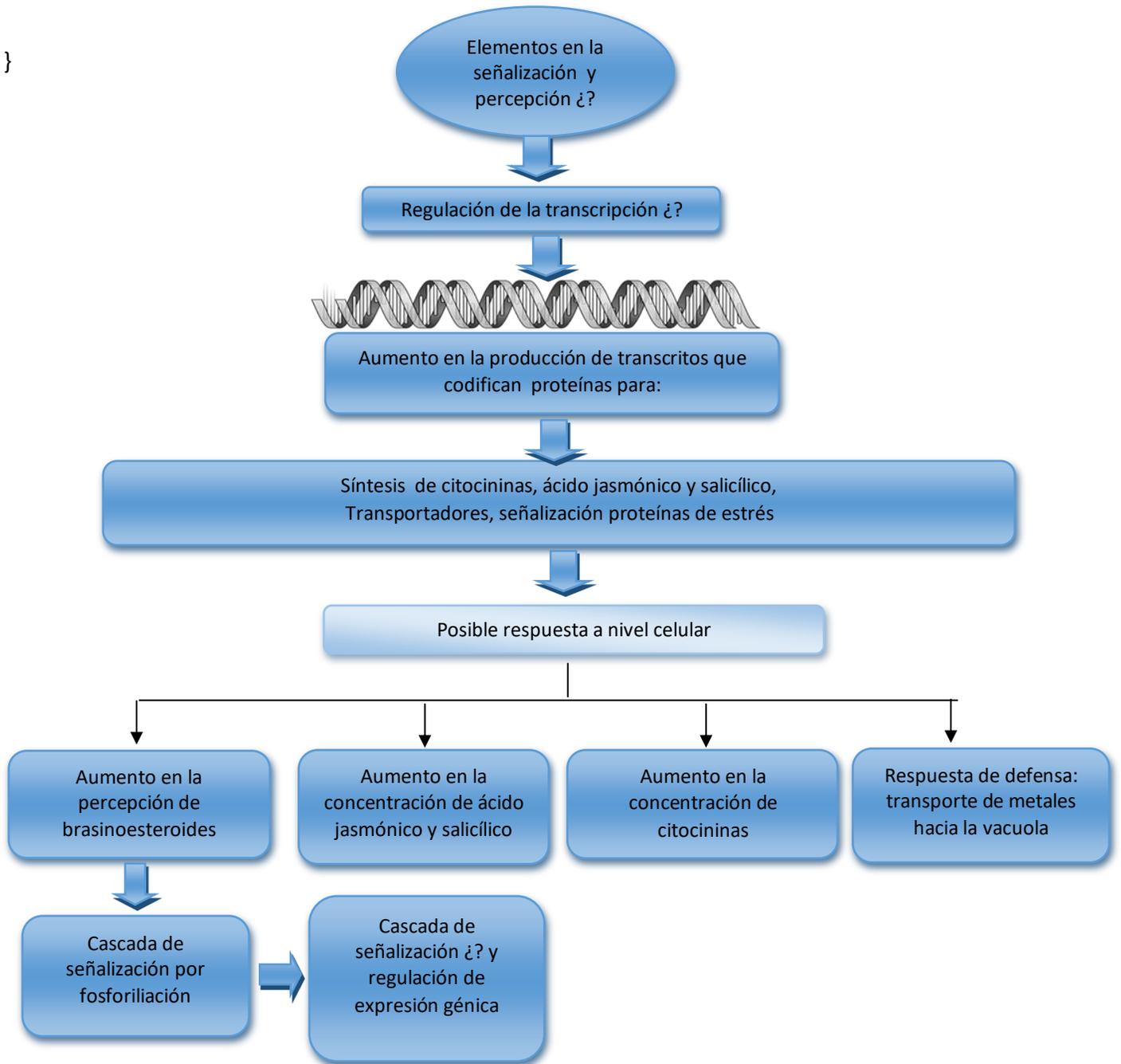


Figura 10. Diagrama integrativo de la respuesta a nivel transcripcional y celular de *F. esculentum* en común a los metales Al, Cu y Zn a las 48 h de tratamiento.

## 5.2 Genes seleccionados para clonación y secuenciación

El análisis comparativo de transcriptomas (mediante hibridación de microarreglos) de raíces de plántulas de *Fagopyrum*, expuestas durante 24 h a los metales Al, Cu y Zn, reveló que 264 genes son inducidos en respuesta general a estos metales. Dentro de estos genes, se seleccionaron, en un principio, aquellos que han sido asociados (por reportes en la literatura) con la respuesta de las plantas a la toxicidad por metales, como el transportador *YSL1* (AT4G24120) y *MRP1* (AT1G30400) los cuales están implicados en el transporte de metales, en complejos con nicotianamina o fitoquelatina-metal (según corresponda). Se encontraron también genes implicados en la síntesis de hormonas IAA y ABA, el gen *ASA1* (AT5G05730), que codifica la subunidad  $\alpha$  de la enzima limitante en la síntesis de Trp intermediario en la síntesis del ácido indolacético, el gen *ZEP* (AT5G67030) que codifica para la enzima limitante en la vía de síntesis de ABA, y el gen *ATERF-2* (AT5G47220) que es un factor de transcripción de respuesta a etileno que podría estar involucrado en la vías de señalización por hormonas inducidas en respuesta a la aplicación de metales (Sun *et al.*, 2010; Keunen *et al.*, 2016).

Si bien se han estudiado algunos de los elementos génicos de la planta de *Fagopyrum* en respuesta a metales como el Al (Yokosho *et al.*, 2014; Reyna-Llorens *et al.*, 2015), los elementos génicos implicados en la red de respuesta general a metales no han sido estudiados. En el momento en que se inició este trabajo, el genoma de *Fagopyrum* no había sido secuenciado por lo que se procedió con la clonación de fragmentos de los genes de interés en la respuesta común al estrés por metales.

De los genes seleccionados únicamente fue posible clonar y secuenciar a tres de ellos: *YSL1*, *ASA* y *ZEP*.

### 5.3. Clonación y aislamiento de secuencias parciales de algunos de los genes compartidos a las 24 h en respuesta a los metales

#### 5.3.1 Secuencia parcial del gen *FeYSL3*

En un inicio, los oligonucleótidos F-5'ACYGCKGTTCTCATYAATGG3' (degenerado) y R-5'TGCCGTAGTTATAAGCCATGTT 3' (Tabla 2), fueron diseñados con el objetivo de obtener un fragmento de la secuencia del gen *YSL1* de *Fagopyrum*. Al realizar la clonación y la posterior secuenciación usando estos oligonucleótidos se generó un fragmento de secuencia de 753 pb (figura 11), el cual se comparó con lo registrado en la base de datos de NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, y de entre todas las secuencias en la base, presentó una identidad de 74.31% con el gen *YSL3* de la planta *Beta vulgaris*. La comparación con los homólogos correspondientes a los transportadores YSL en *A. thaliana*, arrojó que el fragmento parcial obtenido de *F. esculentum* posee una identidad del 66.98% con *AtYSL3*, 66.40% con *AtYSL2*, 63.04% con *AtYSL1*, 59.19% con *AtYSL7*, 59.04% con *AtYSL5*, 58.76% con *AtYSL8*, 57.51% con *AtYSL4* y 55.76% con *AtYSL6*. Es importante resaltar que cada uno de los ocho transportadores YSL reportados en *A. thaliana*, corresponden a genes diferentes y no a variantes trasccripcionales o isoformas. Por otro lado, secuencias de genes YSL en el genoma de *F. tartaricum* (Zhu *et al.*, 2015), se alinearon junto con la secuencia parcial obtenida y se determinó un 94.51% de identidad con *FtYSL3* (comp18585), 80.05% con *FtYSL3* (comp7089), un 64.25% con *FtYSL1* (comp24895), 58.63% con *FtYSL7* (comp6342), 56.89% con *FtYSL6* (comp23883) y 53.55% con *FtYSL7* (comp13827). Por todo lo anterior, concluimos que el producto obtenido de la amplificación correspondía a *YSL3* (*FeYSL3*) y no al gen inicialmente buscado, el *YSL1* (*FeYSL1*).

5'ACTGCTGTTCTCATCAATGGGTTTCACACGGCTAAAGGAGACAAGAATGCCAAGAATCAAGTTAATGGATTTGTCAAAT  
 TTTCTCCTTGAGCTTCTGTGGAGCTTCTCCAGTGGTTCTATTCCGGAGGAAATACTTGTGGCTTTGGCCAATTCCTACTTT  
 TGGATTGCAGGCTTGGAAAACTCTTTTACTTCGATTTTACCATGAGCTATGTTGGAGCTGGAATGATATGTTCTCATCTTG  
 TGAAGTCTCACTTCTTCTTGGCGCAACTCTCTCATGGGGTGTGATGTGGCCAATTATTCACGGGTTCAAAGGAAAGTGGTT  
 TCCTGCATCAATACCCGAGAGCAGTATGAAAAGTCTTAATGGTTATAAGGTATTTATTTCTATTGCCCTCATACTTGGAGATG  
 GGCTTTATAACTTTCTTAAGGTGCTCTATTACACCATGAGAAACATCTATGCCAGATTGAAGGAAAAGAACAGCAGAACCTT  
 TTCGGAGAGCCAAACTGAACGATTGGATGATCTTCAACGGAACGAGATCTTTGTAAGAGAAACTATTCTGTTTGGCTTGCC  
 TGCATTGGATACGGAGTCTTGGCAGTGGTTCCATCATTGTTATCCCCCTTATGTTCCCTGAGCTGAAGTGGCACTATGTTGT  
 GGCTGCCTACATCCTTGCACCTTCTCTCAGCTTCTGCAATGCATATGGTGCCGGTTTGACTGACATGAACATGGCTTACACTA  
CGGAC3'

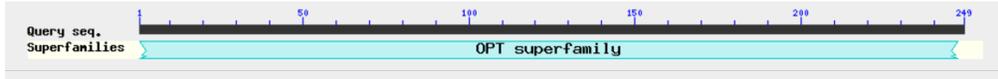
**Figura 11. Secuencia parcial (753 pb) del gen *FeYSL3*.** Las secuencias correspondientes a los cebadores F-5'ACYGCKGTTCTCATYAATGG3' y R-5'TGCCGTAGTTATAAGCCATGTT 3' se encuentran subrayadas.

La secuencia parcial del gen *YSL3* se tradujo *in silico* usando el servidor libre ExpASy <http://www.expasy.org/> (figura 12 a), con este resultado se realizó un análisis de identidad con proteínas empleando BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y CLUSTALOMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Esta secuencia correspondió con un fragmento de la firma **K(F/R)L(T/P/A)(Y/F)PSG(T/L/S)ATA(V/M/H)LIN** y con el dominio conservado **OPT** (Oligopeptide Transporter), características de las proteínas de la familia de transportadores YSL (Yellow Stripe Like) (figura 12 a y b). Estos transportadores transmembranales están involucrados en la homeostasis de Fe y el transporte a larga distancia de metales unidos con nicotianamina (NA) en plantas dicotiledóneas (DMA) (Gendre *et al.*, 2006). El análisis del alineamiento con ésta secuencia (figura 12 c) mostró una identidad del 66.67 % con la proteína YSL3 de *A. thaliana* (AT5G53550), del 74.70 % con la proteína YSL3 de *Nicotiana silvestris* (XP\_009763791.1), 75.10 % de identidad con la proteína YSL3 de *Beta vulgaris* (XP\_010671367.1), 75.90 % con la proteína YSL3 de *Glycine max* (XP\_003527996.2), 76.71 % con la proteína YSL3 de *Theobroma cacao* (XP\_007039162.2) y 95.98 % de identidad con la proteína YSL3 de *F. tartaricum*.

a)

TAVLINGFHTAKGDKNAKNQVNGFVKIFLSLWSFFQWFYSGGNTCGFGQFPFGLQAWKNSFYFDFTMSYVGAG  
MICSHLVNCSLLLGATLSWGVMWPIIHGFKGKWFPAIPESMKS LNGYKVFISIALILGDGLYNFLKVLYYTMRNIYAR  
LKEKNSRTFSESQTERLDDLQRNEIFVRETIPVWLACIGYGLAVVSIIVIPLMFPELKWVHYVVAAYILAPSLSFCAAYGA  
GLTDMN MAYTTD

b)



c)

Arabidopsis thaliana YSL3	LVPLRKIMIIDYKLYPSGTATAV LINGFHTPKGNKMAKKQVFGV KYFSFSFIWAFFQW
Glycine max YSL3	LVPIRKIMIIDYKLYPSGTATAV LINGFHTPKGDVMAKKQVHGFLKFFSASFLWAFFQW
Beta vulgaris YSL3	LVPLRKIMIIDYKLYPSGTATAV LINGFHTPKGDKMAKKQVHGFLKYPMSFLWGFFQW
Nicotiana sylvestris YSL3	LVPLRKIMIIDYKLYPSGTATAV LINGFHTPKGDKMAKKQVNGFLRFFSISFIWSFFQW
Theobroma cacao YSL3	LVPLRKIMIIDYKLYPSGTATAV LINGFHTPKGDKIAKKQVHGFLKFFSLSFLWAFFQW
Fagopyrum tartaricum YSL3	LVPLRKIMIIDYKLYPSGTATAV LINGFHTAKGDKNAKNQVNGFVKIFLSLWSFFQW
<b>FeYSL3</b>	<b>-----TAVLINGFHTAKGDKNAKNQVNGFVKIFLSLWSFFQW</b>
	***** ** * * * * * * * * * *
Arabidopsis thaliana YSL3	FFSGGTECGFIQFPFGLKAWKNSFYDFDMSYVYGAGMICPHIVNISLLFGAVLSWGIMW
Glycine max YSL3	FYSGGDNCGFVQFPFGLKAWKNSFYDFDMSYVYGAGMICSHLVNLSLLGAVISWGIMW
Beta vulgaris YSL3	FYSGGDQCGFSQFPFGLKAWNSFYDFDMSYVYGAGMICSHLVNLSLLFGAILSWGVMW
Nicotiana sylvestris YSL3	FYSGGDQCGFVNFPFGLKAWKQTFYDFDMSYVYGAGMICSHLVNLSLLGAVLSWGIMW
Theobroma cacao YSL3	FYAGGDRCGFAQFPFGLTAWKNSFYDFDMSYVYGAGMICSHLVNLSLLGAVLSWGVMW
Fagopyrum tartaricum YSL3	FYSGGNTCGFGQFPFGLQAWKNSFYDFDMSYVYGAGMICSHLVNLSLLGATLSWGVMW
<b>FeYSL3</b>	<b>FYSGGNTCGFGQFPFGLQAWKNSFYDFDMSYVYGAGMICSHLVNCSLLLGATLSWGVMW</b>
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Arabidopsis thaliana YSL3	PLIKGLKGDWFPSTLPENSMKSLNGYKVFISIALILGDGLYQFIKILFKTGINMYVKLNN
Glycine max YSL3	PLIRGLKGEWFPASIPESMKS LNGYKVFISIALILGDGLYNFVKVLYFTATNIHATVKR
Beta vulgaris YSL3	PLIGNLKGKWFPSLPESMKS LNGYKVFISIALILGDGLYNFLKILLFTIRNIHVRLKD
Nicotiana sylvestris YSL3	PLISDRKGAWFPATLPENSMRSLNGYKVFISIALILGDGLYNFLKTLFFTGRRIYAALNK
Theobroma cacao YSL3	PLIGGLKGEWFAATLPESMKS LNGYKVFISIALILGDGLYNFLKILFFTARS IHVRVKN
Fagopyrum tartaricum YSL3	PLIHGFKGWFPASITESMKS LNGYKVFISIALILGDGLYNFLKVLYYTMRNIYARLKE
<b>FeYSL3</b>	<b>PIIHGFKGWFPASIPESMKS LNGYKVFISIALILGDGLYNFLKVLYYTMRNIYARLKE</b>
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

**Figura 12. Análisis de la secuencia parcial del gen *FeYSL3*.** a) Predicción de la secuencia proteica (249 aa) del gen *FeYSL3* usando el servidor ExPASy, la firma de los transportadores YSL se encuentra subrayada. b) dominio conservado con la familia de transportadores de oligopéptidos (OPT). c) alineamiento de *FeYSL3* (en rojo) contra secuencias proteicas de YSL3 en otras especies. Con asteriscos se indica la posición de los residuos conservados entre secuencias.

Con la finalidad de corroborar la secuencia para el gen *YSL3* en *Fagopyrum*, se empleó la estrategia de diseñar oligonucleótidos específicos, para esto se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas y nucleotídicas reportadas del gen *YSL3* de *A. thaliana*, de *F. tartaricum* (Zhu *et al.*, 2015) y de otras especies de plantas. Del alineamiento se seleccionaron regiones conservadas en secuencia nucleotídica y se sometieron a un segundo alineamiento con el archivo DRX007657 que corresponde con un ensayo

de RNA-seq en raíces de *F. esculentum*. Con éste último alineamiento y con el archivo de *F. esculentum*, se fueron obteniendo fragmentos cortos (100 pb) de secuencia, los cuales fueron ensamblados de manera manual a fin de obtener alrededor de 911 pb ensambladas (Ver anexo, figura 2A). A partir de esta secuencia del gen *YSL3* de *F. esculentum*, se diseñaron diversos juegos de oligonucleótidos específicos, entre los cuales: F-5'ACTGCTGTTCTCATCAATGG3' y R-5'GCCGTAGTTGTAAGCCATGTT3' se emplearon para clonar una secuencia de 753 pb. Al realizar un alineamiento con la secuencia obtenida anteriormente (figura 13) se observó que no son idénticas, presentando un 81 % de similitud entre ellas. Debido a las disimilitudes a lo largo de toda la secuencia, inicialmente, se consideró este resultado como consecuencia del empleo de una polimerasa incapaz de realizar la corrección de errores (Taq Polimerasa Recombinante, Invitrogen). Sin embargo, subsecuentes análisis nos permitieron descartar esta idea.

```

FeYSL3_cebado=es_especificos      ACTGCTGTTCTCATCAATGGGTTTCATACAGCAAAGGAGACRAGATGGTCRAGAAGCCAA
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    ACTGCTGTTCTCATCAATGGGTTTCACACAGGCTAAAGGAGACRAGAAATGCCRAGAAATCAA
*****
FeYSL3_cebado=es_especificos      GTAAGCGGGTTTGTGAAAACCTTCTCTTTTCAGCTTCTTTTGGAGTTTAAATCCAAATGGTTC
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    GTTAATGGATTGTGCRAAAATTTTCTCCTTGAGCTTCCCTGTGGAGCTTCTTCCAGTGGTTC
** * ** ***** ** * ***** * ***** ** **** *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      TADCCCGGTGGAGTAGTTGTGGGTTTCGCCCAATTCCTACATTTGGGTTGCCAAGCTTGG
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    TATTCGGGAGGAAATACTTGTGGCTTTGGCCCAATTCCTACTTTTGGATTGCCAGGCTTGG
** **** ** * ***** ** * ***** ***** ***** ***** *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      AAAAAGCTCCTTTTACTTTTGTATTTTAGTATGAGTTATGTTGGAGCTGGAAATGATATGTTCT
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    AAAAAGCTCCTTTTACTTTCGATTTTACCATGAGCTATGTTGGAGCTGGAAATGATATGTTCT
*****
FeYSL3_cebado=es_especificos      CATCTTGTCAACCTGTCTATTGCTTCTTGGTGGGATTCTCTCGTGGGGGGTAAATGTGGCCA
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    CATCTTGTGAACTGCTCACTTCTTCTTGGGCAACTCTCTCATGGGGTGTGATGTGGCCA
***** ** * ***** ** * ***** ***** ** * *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      CTCATTCAATGGGCTGAAAGAAATGGTTCCTGCTCAATACCCGCAAGCAGTATGAAA
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    ATTATTCAAGGGTTCCRAAGGAAAGTGGTTTCTGCTCAATACCCGCAAGCAGTATGAAA
* ***** ** * ***** ***** ***** ***** *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      AGTCTCAATGGTTATRAGGTTTTCATATCGATTGCTCTCATACTTGGAGATGGGCTCTAT
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    AGTCTTAAATGGTTATRAGGTTTATTTCTATTGCTCTCATACTTGGAGATGGGCTCTAT
***** ***** ** * ***** ***** ***** ***** *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      AGTTTTCTCARGGTARTGTTTTTCACCATGAAAAACATTCATGCCRTGTTGAGGAAAAG
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    AACTTTCTTARAGGTCTCTATTACCCATGAAAAACATTCATGCCAGATTGAGGAAAAG
* ***** ** * ***** ***** ***** ***** *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      AATATCAAAGCTTTTTCAGAAATCAGAAAGCCATAGTCAATCGCTGGATGAGCTTCCAGAGG
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    AACAGCAGAACCTTTTTCGG-----AGAGCCAAACTGAAAGATTGGATGATCTTCCACAGG
** * ** * ***** * ***** * ***** * ***** **
FeYSL3_cebado=es_especificos      AACGAACTCTTCATARGAGAAACTATTCCGGTTTGGATTGCTTGGGTAGGATACACAGTG
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    AACGAACTCTTTGTARGAGAAACTATTCCCTGTTGGCTTGGCTGCAATGGATAGGAGTTC
***** ** * ***** ***** ***** ***** ** * *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      TTGGCAGTGGTTTCTGTGATCGCTATCCCOCTCATGTTCCCGAGTTGAGATGCTACTAC
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    TTGGCAGTGGTTTCCATCATTTGTATCCCOCTTATGTTCCCTGAGCTGAAAGTGGCCTAT
***** ** * ***** ***** ***** ***** ** * *****
FeYSL3_cebado=es_especificos      GTCGTTGTAGCCTACATTCCTGCTCTCTCTTAAGCTTCTGCAATGCCATGGTCTGCTG
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    GTTGTGGCTGCTACATTCCTGCACTTCTCTCAAGCTTCTGCAATGCCATGGTCTGCTG
** * * ***** ** * ***** ***** ***** ***** **
FeYSL3_cebado=es_especificos      CTGACTGACATGAACRTGGCTTATRACTAAGGC
FeYSL3_cebado=es_inespecificos    TTGACTGACATGAACRTGGCTTACACTAAGGC
***** ***** * *** *

```

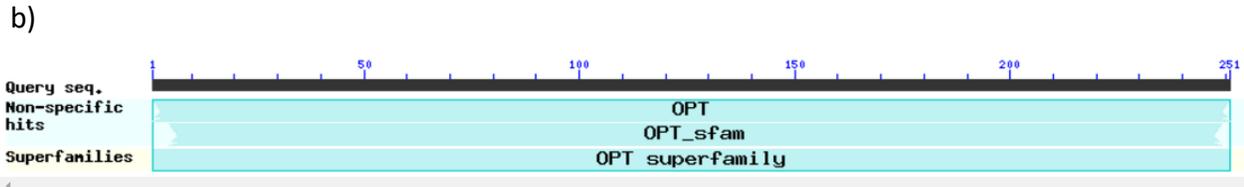
**Figura 13.** Alineamiento entre fragmentos de secuencias de *FeYSL3*. Con asteriscos se indica la posición de los residuos conservados entre secuencias.

Al alinear este nuevo fragmento con las secuencias de los genes *YSL* en *A. thaliana* y de *F. tartaricum*, se obtuvo 69.60 % de identidad con *AtYSL3*, 69.09 % con *AtYSL2*, 65.45 % con *AtYSL1*, 61.89 % con *AtYSL5*,

60.99 % con *AtYSL7*, 60.70 % con *AtYSL8*, 56.99 % con *AtYSL4*, 55.66 % con *AtYSL6* y 94.02 % de identidad con *FtYSL3* (comp7089), resultado diferente al obtenido con la primer secuencia de *FeYSL3* clonada, la cual posee identidad del 80.05 % con *FtYSL3* (comp7089). Con respecto a los demás YSL de *F. tartaricum*, el segundo fragmento clonado posee 82.73 % de identidad con *FtYSL3* (comp18585), 64.53 % con *FtYSL1* (comp24895), 58.96 % con *FtYSL7* (comp6342), 57.77 % con *FtYSL6* (comp23883) y 54.65 % con *FtYSL7* (comp13827).

Al realizar la traducción *in silico* del nuevo fragmento de *FeYSL3* (figura 14 a) y contrastando con los datos de NCBI, se observó que este fragmento posee identidad proteica con YSL3 de otras especies y el dominio OPT conservado en la familia de transportadores YSL (figura 14 b). Por otro lado, al realizar los alineamientos entre las dos secuencias proteicas obtenidas para YSL3 de *F. esculentum* (figura 14 c), se observa que entre ambas existe un 81 % de identidad.

a)  
**TAVLING**FHTAKGDKMVKKQVSGFVKTFSSFFWSLIQWFYAGGGSCGFAQFPTFGLQAWKNSFYDFDSMSYVGAG  
MICSHLVNLSLLLGAISWGVMWPLIHGREGKWFPPASIPASSMKSLNGYKVFISIALILGDGLYSFLKVMFFTMKNIHA  
MLKEKNIKTFSSESQS~~SLDELQRNEL~~FIRETIPVWIACVGYTVLAVVS~~VIAIPLMFPELRWYVVVAYILAPSL~~SFCNAY  
GAGLTDMMAYNYG



c)

FeYSL3_cebadores_especificos	TAVLINGFHTAKGDKMVKKQVSGFVKTFSSFFWSLIQWFYAGGGSCGFAQFPTFGLQAW
FeYSL3_cebadores_inespecificos	TAVLINGFHTAKGDKNAKNQVNGFVKIFSLFLWSFFQWFYSGGNTCGFGQFPFGLQAW
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FeYSL3_cebadores_especificos	KNSFYDFDSMSYVGAGMICSHLVNLSLLLGAISWGVMWPLIHGREGKWFPPASIPASSMK
FeYSL3_cebadores_inespecificos	KNSFYDFDTMSYVGAGMICSHLVNCSLLLGATLSWGVMWPIIHGFKGKWFPPASIPASSMK
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FeYSL3_cebadores_especificos	SLNGYKVFISIALILGDGLYSFLKVMFFTMKNIHMLKEKNIKTFSSESQS <del>SLDELQR</del>
FeYSL3_cebadores_inespecificos	SLNGYKVFISIALILGDGLYNFLKVLTYTMRNIYARLKEKNSRTFSSESQTER--LDDLQR
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FeYSL3_cebadores_especificos	NELFIRETIPVWIACVGYTVLAVVS <del>VIAIPLMFPELRWYVVVAYILAPSL</del> SFCNAYGAG
FeYSL3_cebadores_inespecificos	NEIFVRETIPVWLACIGYGLAVVSIIVIPLMFPEL <del>KWHYVVAAYILAPSL</del> SFCNAYGAG
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FeYSL3_cebadores_especificos	LTDMMAYNYG
FeYSL3_cebadores_inespecificos	LTDMMAYTTD
	*****

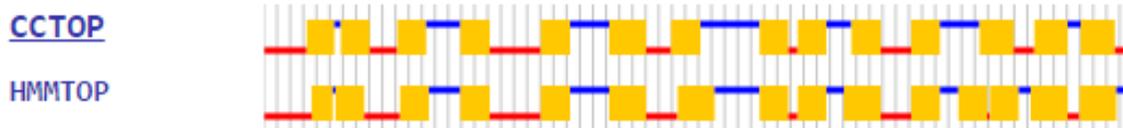
**Figura 14. Análisis de la segunda secuencia parcial del gen *FeYSL3*.** a) Predicción de la secuencia proteica (251 aa) del gen *FeYSL3* usando el servidor ExpAsy. b) dominio conservado con la familia de transportadores de oligopéptidos (OPT), y c) alineamiento de secuencias parciales de *FeYSL3*. Con asteriscos se indica la posición de los residuos conservados entre secuencias.

En la base de datos BGDB (Buckwheat Genome Database) <http://buckwheat.kazusa.or.jp/>, liberada en el 2015 por el Instituto Kazusa de investigación en ADN, se encuentra registrado el genoma completo de *Fagopyrum esculentum* Moench ( $2n = 2x = 16$ ) con 286,768 secuencias codificantes, que al igual que *F. tartaricum* posee dos secuencias que coinciden con el ID AT5G53550 del gen *YSL3* de *A. thaliana* (usado como referencia en este trabajo), las secuencias: Fes\_sc0000113.1.g000033.aua.1 /f (1983 pb) y Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1 /f (2040 pb) que poseen un 82.73 % de similitud entre ellas. Al realizar alineamientos entre las secuencias en la base de datos BGDB contra las secuencias parciales encontradas para el gen *FeYSL3* en este trabajo, se observa que existe un 99.06 % identidad entre el fragmento obtenido con uno de los oligonucleótidos degenerados y la secuencia Fes\_sc0000113.1.g000033.aua.1 /f. El fragmento obtenido con los oligonucleótidos específicos posee un 95.44 % de identidad contra la secuencia Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1 /f. La diferencia de 4.56 % entre secuencias se debe a un fragmento de 69 pb, localizado en el nucleótido 1037 de la secuencia completa de Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1 /f. Por todo lo anterior, se concluye que *Fagopyrum* posee dos versiones diferentes de proteínas YSL3 codificadas cada una por un gen específico.

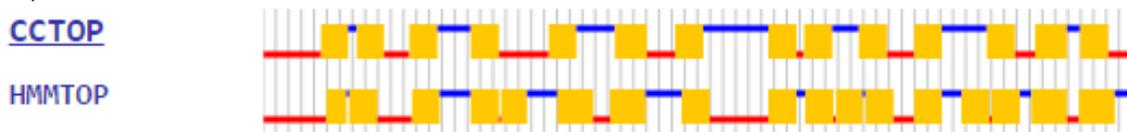
Con el marco de lectura abierto de las secuencias completas Fes\_sc0000113.1.g000033.aua.1 /f y Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1 /f, extraído de la base de datos BGDB, se llevo a cabo la predicción de los modelos proteicos empleando para ello los servidores online CCTOP (Constrained Consensus TOPology prediction server) y HMMTOP (Prediction of transmembrane helices and topology of proteins). Los modelos indican que ambas proteínas pertenecen a la familia de los transportadores de oligopéptidos y contienen de 14 a 17 cruces transmembranales (figura 15 a y b), similar a lo encontrado con proteínas de otras especies dentro de esta familia, con 12 a 14 cruces (Lubkowitz *et al.*, 1998). A nivel de proteína, los transportadores de la familia YSL muestran dos regiones hipervariables, la primera parece estar relacionada con un bucle externo a la membrana que se predice estar entre el sexto y séptimo cruce transmembranal según modelos realizados para las proteínas HvYS1 y ZmYS1. Se sugiere que ésta región podría ser la encargada de otorgar la especificidad para la selección del

sustrato a transportar, conclusión a la que se llegó con estudios de expresión del gen *HvYSL1* en oocitos de *Xenopus*, que reveló que los residuos 314 a 385 son los responsables de la selectividad para Fe(III)-DMA contra Fe(II)-NA. La segunda región hipervariable recae en el extremo amino terminal de las proteínas YSL, el significado de la variabilidad de esta región aún se desconoce.

a)



b)



**Figura 15. Análisis de topología proteica. A)** Predicción: secuencia **Fes\_sc0000113.1.g000033.ua.1 (/f)**, y **B)** predicción: secuencia **Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1 /f**. En color amarillo se muestran los cruces transmembranales, en color rojo los bucles que se encuentran en el interior de la célula y en azul aquellos bucles que se encuentran en el exterior.

En las regiones hipervariables entre miembros de la familia YSL existen regiones conservadas que permiten clasificarlos dentro de cuatro clados (Conte & Walker, 2012). El análisis a nivel de proteína de las secuencias *Fes\_sc0000113.1.g000033.aua.1/f*; *Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1 /f* y los fragmentos parciales para *FeYSL3*, reveló que entre secuencias existen diferencias que se deben a un fragmento de 28 aa, ubicado entre los residuos 346–374, que cae dentro de la región hipervariable de los transportadores YSL. Las secuencias proteicas de *Fes\_sc0000113.1.g000033.aua.1/f* y *Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1 /f*, se compararon con diferentes miembros de la familia YSL correspondientes a cada clado, y se determinó que se encuentran dentro de los ortólogos a YS1 (figura 16). Se ha determinado que diversos miembros de los ortólogos a YS1 son capaces de transportar una

serie de metales además del Fe. Estos incluyen a ZmYS1, el cual es capaz de transportar Zn, Cu, Ni, Mn y Co ligados al ácido desoximugénico (DMA) (Conte y Walker, 2012). En éste trabajo, el análisis de transcriptomas por microarreglos de *Fagopyrum* expuesto a los metales Al, Cu y Zn a las 24 y 48 h, mostró que el gen *YSL3* no es inducido por los metales. Para conocer si las proteínas YSL3 de *F. esculentum* son capaces de transportar diversos metales, habría que realizar otro tipo de estudios, como el análisis por complementación con levaduras (Conte y Walker, 2012).

## Ortológos de YS1

```

Fes_sc0001254.1.g000005.aua.1      KGYEYHGDGIHKS IAHSKPVVVTIVSESE SHSQSLDELQRNE LF
Fes_sc0000113.1.g000033.aua.1      KVLYYTMRNI YARLK---EKN---SRT FSE SQT ERLLDQLRNE IF
HvYS1                                KIVGITAMSMYRQFS---HKQVNNKAKNA- DDTVSLDELHRQE IF
BdYS1A                               KII GITSKSMYRQFN---HKRVENRVRNV- DNT IALDELQRVE VF
ZmYS1                                KVFQVTVKSLHQRLS---RKRATNRVANGGDEMAALDQLRDE IF
OsYSL15                              KVTGVTAKSLHNRFN---RKSVSNTASEE- GDMVSLDQLRDE VF
*          . : :      :          . .      * : : * * * : *

```

### Clado 1

```

Bd_YSL3                               -MLLITAYNDYRLKRQE--TDSVVANYLKRHPS LNYDDRKRIE VF
Os_YSL16                             KVI VVTLKSVRE---RSRRRGL--NNRVADADTMAIDDMQRNE VF
Os_YSL2                               KVTGITAKSLHE---RSNRRH---AKKATDEDT FVIADMQRDE FF
Fes_sc0001254.1.g000005.aua.1      KGYEYHGDGIHKS IAHSKPVVVTIVSESE SHSQSLDELQRNE LF
Fes_sc0000113.1.g000033.aua.1      KVLYYTMRNI Y---AR---LKEKNSRT FSE SQT ERLLDQLRNE IF
Os_YSL9                               KIVALTIKQLF---DS---SKLKNK---KGEDMPVLDELHRNE VF
BdYSL9                                KII VSTTMNLL---DK---SKLKNTK--KEEDI LPLDELHRNE VF
          .          :          :          :          :          :          :          :          :          :

```

### Clado 2

```

OsYSL6                                -----KIIYATIKEVMNARSKQGRPLP-VRVHDDDEG-SKLSAEKK
OsYSL5                                -----KVFLIIAKE ICNARSKHDLPV-QALLQDDSSRQLLDEKR
AtYSL4                                -----KE ICNKS SRQHNLPV-FTDILDKSKT SVLMREKK
AtYSL6                                KVFIAIAIILGDLGYNLKVIIAVTVKELCSRSRRLNLP-VTDGVDDSEASEILLVKK
Fes_sc0000113.1.g000033.aua.1      -----KVLYYTMR-NIY-----ARL-----KEKNSRT FSESQTERLDDL
Fes_sc0001254.1.g000005.aua.1      -----KGYEYHGDGIH-----KSI-AHSKPVVVTIVSESESHSQSLDEL

```

### Clado 3

```

OsYSL17                              SALVRTACAMRKRRRGAS-----TVTAAVPPFQCLSATERTMQSFDRRRAQV
Fes_sc0001254.1.g000005.aua.1      -----KGYEYHGDGIHKSIAHSKPVVVTIVS-----ESESHSQSLDELQRNEL
Fes_sc0000113.1.g000033.aua.1      KVLYYTMRNIYARLKEKN-SR-----TFSESQTERLDDLQRNEI
AtYSL5                                KVLRSRTL SGLFVQLRGPTT SI-----SRTSFTLEEDPH--ASPLSPKQSYDDQRRTRF
AtYSL8                                KVLIRTF SGLISQIRGKAGSR-----SSLAHKEDPPASPA SPLT PRI SYDDQRRTRF
OsYSL10                              KVMTRTTALVMQVRAMMSEP-----TLPVSG--GGG---QTPEETFDDKRRTEL
OsYSL13                              RMII LTAFLRSQIKK-KNAS-----TLPVSD--DGM-V-TTAAVSYDEERRNEL
AtYSL7                                KVLGRTVFGLYKQFKN-K-D-----VLPIND--HTS--TAPVTI SYDDKRRTEL
OsYSL11                              KVFYGTIINGFIVMYKN-KNSN-----TLPISD--NGT-PANATEEE SFDDKRRNEL
OsYSL12                              KVLIRTTAGFVVMKK-N-S-----TLPVSN--NGS-PMVATEAL SFDDERRTEL
OsYSL14                              KVLIRTTAGFISMVQN-NSKG-----MLPVSD--NGM-SMSTAEV SFDDERRTEI

```

**Figura 16. Dominio de bucle variable en la familia de transportadores YSL.** Cada subgrupo de proteínas YSL se analizó por separado usando CLUSTAL OMEGA, con el fin de resaltar las regiones del dominio variable que se conservan entre las proteínas correspondientes a cada clado. El análisis incluyó los transportadores YSL de *Arabidopsis* (At), maíz (Zm), *Brachypodium distachyon* (Bd) y arroz (Os). Con asteriscos "\*" se indican las regiones que poseen un residuo totalmente conservado. Con doble punto ":" se indica la conservación entre residuos con propiedades fuertemente similares, con un solo punto "." Se indica la conservación entre residuos con propiedades débilmente similares.

### 5.3.2 Secuencia del fragmento del gen *FeYSL1*

Con el propósito de obtener con certeza el fragmento del gen *FeYSL1*, se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia obtenida por el ensamble de segmentos de 100 pb provenientes del archivo DRX00765 (correspondiente al análisis del genoma de raíces de *F. esculentum* por RNAseq). Con lo anterior se generó una secuencia de 559 pb (ver Anexo, figura 3 A). Usando los oligonucleótidos específicos F-5'ATGGACCGAGCAGATCACGTTA3' y R-5'AGTAGCCATTCCACTTGGGTATG 3' descritos en la tabla 5, la secuencia parcial (484 pb) obtenida para el gen *FeYSL1* (figura 17), corresponde a un 24.4 % de la secuencia total del gen *AtYSL1* (2022 pb) (secuencia empleada como referencia en este trabajo). Al examinar el fragmento de 484 pb, coincide con 75 % de identidad con el gen *YSL1* de la planta *Beta vulgaris*, secuencia con la que presenta la mayor identidad al compararla contra los datos de NCBI. El porcentaje de identidad obtenido del alineamiento con los ocho cDNAs de *AtYSLs* y la secuencia parcial de *FeYSL1*, es de 79 % con *AtYSL1*, 68.39 % con *AtYSL3*, 65.70 % con *AtYSL2*, 61.68 % con *AtYSL7*, 61.40 % con *AtYSL8*, 59.91 % con *AtYSL5*, 59.30 % con *AtYSL4* y 59.09 % con *AtYSL6*.

El alineamiento múltiple entre las secuencias de genes de YSL en *F. tartaricum* y *FeYSL1* presentó un 94.63 % de identidad con *FtYSL1* (comp24895), 67.77 % con *FtYSL3* (comp18585), 66.74 % con *FtYSL3* (comp7089), 55.42 % con *FtYSL6* (comp23883), 34.19 % con *FtYSL 7* (comp6342), 34.98 % con *FtYSL7*

```
5'ATGGACCGAGCAGATCACGTTACGAGGAGTCGTTGTGAGCGTGATTCTTGGTGTGATCTACAGCATTATAGCT
ATGAGGTTAAACCTCACTACTGGTCTTAGTCTGAATCTTAACGTCTCTGCCGGTCTTCTCGCCTTTGTGCTCATTG
CTCTTGACTAAGATACAAGAGAAAGCTGGGTTTTCAACTGTTCCATTCACTAAACAAGAGAATACTATGATTCA
GACTTCTGCTGTTGCTTGTACAGCATTGCACTTGGAGGTGGGTTTGGATCTTATTTGTTAGGACTGAATAAGAA
GACTTATGAGTTAGCTGGTGTGGACACTCAAGGAACTCGCCGGTAGCTATAAGGAACCGGCTGTTGGTTGGA
TGACTTCTTATCTCTTCTTGGTTTCTTTGTTGGCTTGTGGTGTGATTCTCTCAGGAAGATCTTGATAGTAGACT
ATAAATTGACATACCCAAGTGGAATGGCTACT3'
```

**Figura 17. Secuencia parcial (484 pb) del gen *FeYSL1*.** Las secuencias correspondientes a los cebadores F-5'ATGGACCGAGCAGATCACGTTA3' y R-5'AGTAGCCATTCCACTTGGGTATG 3' se encuentran subrayadas.

(comp13827), 66.74 % con *FeYSL3* (Fes\_sc0000113.1.g000033.aua.1) y 67.36 % con *FeYSL3* (Fes\_sc0001254.1.g000005.aua.1) .

En la base de datos BGDB, antes mencionada, se tienen dos secuencias completas de cDNA correspondientes a *YSL1* de *F. esculentum* (Fes\_sc0002823.1.g000004.aua.1) y (Fes\_sc0000553.1.g000027.aua.1 /p). El fragmento de 484 pb obtenido coincide en un 100 % de identidad con Fes\_sc0002823.1.g000004.aua.1 (figura 18) y en 94.63 % con Fes\_sc0000553.1.g000027.aua.1 /p. Con los datos de identidad, se concluyó que se logró obtener la secuencia parcial para el gen que codifica para una de las versiones de la proteína YSL1 en *F. esculentum*.

```

FeYSL1          -----ATGGACCGAGCAGATCACGTTACGAGGAGTCGTTGTGAGC
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  GCACCTCAAGAGAATTCACACATGGACCGAGCAGATCACGTTACGAGGAGTCGTTGTGAGC
                                *****

FeYSL1          GTGATTCTGGTGTGATCTACAGCATTATAGCTATGAGGTTAAACCTCACTACTGGTCTT
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  GTGATTCTGGTGTGATCTACAGCATTATAGCTATGAGGTTAAACCTCACTACTGGTCTT
                                *****

FeYSL1          AGTCTGAATCTTAACGTCTCTGCCGGTCTTCTCGCCTTTGTGCTCATTGCTCTGGACT
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  AGTCTGAATCTTAACGTCTCTGCCGGTCTTCTCGCCTTTGTGCTCATTGCTCTGGACT
                                *****

FeYSL1          AAGATACAAGAGAAAGCTGGGTTTTCAACTGTTCCATTCACTAAACAAGAGAATACTATG
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  AAGATACAAGAGAAAGCTGGGTTTTCAACTGTTCCATTCACTAAACAAGAGAATACTATG
                                *****

FeYSL1          ATTCAGACTTCTGCTGTGCTTGTACAGCATTGCACCTGGAGGTGGGTTGGATCTTAT
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  ATTCAGACTTCTGCTGTGCTTGTACAGCATTGCACCTGGAGGTGGGTTGGATCTTAT
                                *****

FeYSL1          TTGTTAGGACTGAATAAGAAGACTTATGAGTTAGCTGGTGTGGACACTCAAGGAAACTCG
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  TTGTTAGGACTGAATAAGAAGACTTATGAGTTAGCTGGTGTGGACACTCAAGGAAACTCG
                                *****

FeYSL1          CCCGGTAGCTATAAGGAACCGGCTGTTGGTTGGATGACTTCTTATCTCTTCTTGGTTTCC
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  CCCGGTAGCTATAAGGAACCGGCTGTTGGTTGGATGACTTCTTATCTCTTCTTGGTTTCC
                                *****

FeYSL1          TTTGTTGGCTTGTGTTGTGATTCTCTCAGGAAGATCTTGATAGTAGACTATAAATTG
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  TTTGTTGGCTTGTGTTGTGATTCTCTCAGGAAGATCTTGATAGTAGACTATAAATTG
                                *****

FeYSL1          ACATACCCAAAGTGGAAATGGCTACT-----
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1  ACATACCCAAAGTGGAAATGGCTACTGCAAGTTCCTATAAATGGATTTCACTCGCAGGGAGAC
                                *****

```

**Figura 18. Alineamiento entre fragmentos de secuencias de *FeYSL1*.** Con asteriscos se indica la posición de los residuos conservados entre secuencias.

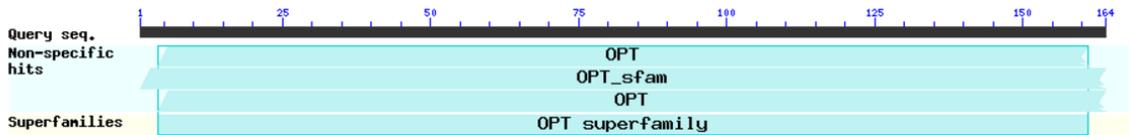
La traducción *in silico* de la secuencia parcial de *FeYSL1* dio un fragmento proteico de 164 aa (figura 19 a), y, al igual que *FeYSL3*, éste gen posee el dominio **OPT** conservado en la familia de proteínas YSL y que corresponde con la región total de 164 aa encontrada para *FeYSL1* (figura 19 b). Los alineamientos con esta secuencia (figura 19 c) mostraron que tiene identidad del 96.34 % con la proteína YSL1 (YELLOW STRIPE 1 PROTEIN) de *F. tartaricum* (comp19716\_c0\_seq3 RNA seq analysis), del 79.27 % con YSL1 de *Beta vulgaris* (XP\_010676897.1), 73.17 % con YSL1 de *Ricinus cummunis* (XP\_002518903.1), 70.12 % con

YSL1 de *Vitis vinifera* (NP\_001268107.1) y 68.90% con YSL1 de *A. thaliana* (AT4G24120). Se concluyó que el fragmento de 484 pb obtenido corresponde al gen *YSL1* de *Fagopyrum esculentum*.

a)

WTEQITLRGVVSVILGVIYSIIAMRLNLTGSLNLNVSAAGLLAFVLRISWTKIQEK  
AGFSTVPFTKQENTMIQTSAVACYSIALGGGFGSYLLGLNKKTYELAGVDTQGN  
PGSYKEPAVGWMTSYLFLVSFVGLFVLIPLRKILIVDYKLTYPG MATIKI

b)



c)

```

Beta_vulgaris_YSL1      --MA-----EKKEQEMK---REDEVENE SDEVVTIARVPPWKQITVRGVVTSAL I
Fagopyrum_tartaricum_YSL1  -----EMKDMRD---SDEDMATE SAQVVKSSRIPTWTEQITLRGVVSVIL
FeYSL1                  -----WTEQITLRGVVSVIL-----
Arabidopsis_thaliana_YSL1 --MEIEQRRIMKREGEEEDDNQLSLQEEEPDTEEMSGRTIEPWTKQITVRGVFVSI VI
Vitis_vinifera_YSL1    --MET---ELKEIEKED-----KE--VQSEKAEETKRLPPWTKQITVRGVIASIVI
Ricinus_communis_YSL1  MSMEVEAKQKKEIEKED-----MEEEARVEAEGVVVRAQPWTKQLTIRGVIVSAVI
                        **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Beta_vulgaris_YSL1      GVIYSIIAMKLNLTGSLPNLNVSAALLAFVFI RAWNQILKKGAFSPAPFTKQENTMIQT
Fagopyrum_tartaricum_YSL1 GVIYSIIAMRLNLTGSLNLNVSAAGLLAFVLRISWTKIQEKAGFSTVPFTKQENTMIQT
FeYSL1                  GVIYSIIAMRLNLTGSLNLNVSAAGLLAFVLRISWTKIQEKAGFSTVPFTKQENTMIQT
Arabidopsis_thaliana_YSL1 GVVF SVIAQKLNLTGIVPNLNSAALLAFVQVQVTKILKKSQFVAKFPTRQENTMIQT
Vitis_vinifera_YSL1    GSMYSVIAMKLNLTGSLPNLNSAALLAFVFI RTWTKLHKHTGFTVTPFTKQENTMIQT
Ricinus_communis_YSL1  GAIYSVIAMKLNLTGSLPNLNVSAALLAFVFI RTWTKILHKAGVAKFPTRQENTMIQT
* :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

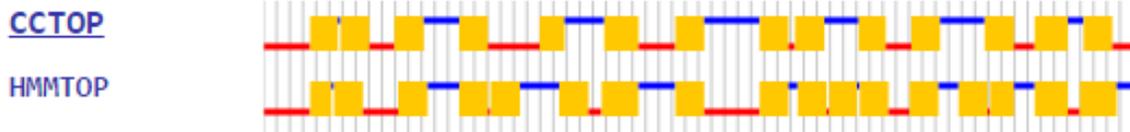
Beta_vulgaris_YSL1      CAVACYSIAIGGGFGSYLLGLNKKTYELAGVNTGNSPTSYKDLKVGWMTAYLFLVCFVG
Fagopyrum_tartaricum_YSL1 SAVACYSIALGGGFGSYLLGLNKKTYELAGVDTQGNSPGSYKEPAVGWMTSYLFLVSVFG
FeYSL1                  SAVACYSIALGGGFGSYLLGLNKKTYELAGVDTQGNSPGSYKEPAVGWMTSYLFLVSVFG
Arabidopsis_thaliana_YSL1 SAVACYGIAVGGGFASYLLGLNKKTYVLSGVNLEGNPKSVKEPGLGWTAYLFLVVCFTG
Vitis_vinifera_YSL1    CSVACYSIAVGGGFASYLVGLNKKTYELAGINTEGNSPTSIKEPGLGWMIGFLFLVCFVG
Ricinus_communis_YSL1  CAVACYSIAVGGGFASYLLGLNKKTYELSGEHTGNSPRAIKEPEFGWMTGFLFLVCFVG
.:****_**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Beta_vulgaris_YSL1      LFVLTPLRKILIVDYQLVFP SGMTAVLINGFHTRGDRMAKKQVRGFLKYF SMSFLWGF
Fagopyrum_tartaricum_YSL1 LFVLIPLRKILIVDYKLTYP SGMTAVLINGFHSQGDVKSKEQVRFPAKFF SMSFLWGF
FeYSL1                  LFVLIPLRKILIVDYKLTYP SGMATIKI-----
Arabidopsis_thaliana_YSL1 LFVLIPLRKVMIVDLKLTYP SGLATAVLINGFHTQGDQAKKQVRGFMKYF SFSFLWGF
Vitis_vinifera_YSL1    LFVLIPLRKVM I DYRLTYPSGTATAVLINGFHSQGDKLAKKQVRGFMKYF SFSFLWGF
Ricinus_communis_YSL1  LFVLIPLRKIMIVDLKLTYP SGLATAVLINGFHTQGDMAKKQVHGFMRYF SISFLWAF
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

```

**Figura 19. Análisis de la secuencia parcial de FeYSL1.** a) Predicción de la secuencia proteica (164 aa) del gen *FeYSL1* usando el servidor ExPASy; b) Dominio conservado con la familia de transportadores de oligopéptidos (OPT); y c) Alineamiento de *FeYSL1* (en rojo) con secuencias proteicas de YSL1 en otras especies. Con asteriscos se indica la posición de los residuos conservados entre secuencias, con puntos “:” se indica la conservación entre residuos con propiedades fuertemente similares.

El marco de lectura abierto de la secuencia Fes\_sc0002823.1.g000004.aua.1, corresponde a una proteína de la familia de los transportadores de oligopéptidos con 14 a 17 cruces transmembranales (figura 20), similar a lo encontrado para *FeYSL3*.



**Figura 20. Análisis de topología proteica.** Predicción: secuencia Fes\_sc0002823.1.g000004.

El análisis de clados de transportadores de la familia YSL, permitió ubicar la secuencia Fes\_sc0002823.1.g000004.aua.1 dentro de los ortólogos a YS1 (figura 21), de igual forma que *FeYSL3*.

Se han determinado los patrones de expresión de *YSL1* y *YSL3* por PCR-tiempo real en *A. thaliana* (Waters *et al.*, 2006), se conoce que ambos genes se expresan tanto en raíces como en la parte aérea; sin embargo, el gen *AtYSL3* es más abundante en raíces. Por otro lado, *AtYSL1* es expresado en hojas cuando existe un exceso de Fe (Le *et al.*, 2005). Se conoce poco a cerca de los transportadores YSL1 y YSL3 y su inducción por metales en la raíz. En el presente trabajo, en el análisis de expresión por microarreglos a las 24 h, se observó que el gen *FeYSL1* es inducido para las tres condiciones con metales, no así a las 48 h, donde sólo la condición con Cu, mostró una inducción (**valor z=1.7**). Aún queda por corroborar esta información y realizar posteriores análisis que permitan conocer la expresión de los genes *FeYSL1* y *FeYSL3* en *Fagopyrum*.

### Ortólogos de YS1

```

Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1      KVVIVMITSVHGRLKLSPEEGDLGEGEDKVGK-ETKHNELF
HvYS1                                KIVGITAMSMYRQFSHKQVNNKAKNA-DDTVSLEELHRQEIF
BdYS1A                               KIIGITSKSMYRQFNHKKRVENRVRNV-DNTIALDELQORVEVF
ZmYS1                                KVFGVIVKSLHQRLSRKRATNRVANGGDEMAALDDLQORDEIF
OsYSL15                              KVTGVTAKSLHNRFRKSVSNTASEE-GDMVSLDDLQORDEVF
* : : * : : . * : : : * : : * :

```

### Clado 1

```

Bd_YSL3                               -MLLITAYND-YRLKRQETDSVVANYLKRHPSLNYDDRKRIEVF
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1      KVVIVMITSVHGRLKLSPEEGDLGEGEDKVGKETKHNELF
Os_YSL9                               KIVALTIKNLFDSSK-----LKNNAK-KGEDMPVLDLHRNEVF
Bd_YSL9_HM443952.1                 KIIVSTTMNLLDKSK-----LKNTK-KEEDILPLDELHRNEVF
Os_YSL16                             KVIVVTLKSVRERSRRR---GLNRRV-ADADTMAIDDMQRNEVF
Os_YSL2                              KVTGITAKSLHERSNRR---H-AKKA-TDEDTFVIADMQRDEFF
: . . . : : : * :

```

### Clado 2

```

Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1      -----KVVIVMITS-----VHGRLKLSPEEGDLGEGEDKVGKETF
OsYSL6                               -----KIIYATIKEVMNARSKQGRPLVVRVHDD--DEG-SKLSAEEK
OsYSL5                               -----KVFLLIAKEICNARKEHDLFPVQALLQD--DDSSRQLLDEKR
AtYSL4                               -----KEICNKSRRQHNLFPVFTDILD--KSKTSLVLMREKK
AtYSL6                               KVFIAIAIILGDGLYNLVKIIAVTVKELCSSRSRRLNLPVTDGVD--DSEASEILLVKK
. . . . * : : :

```

### Clado 3

```

OsYSL17                              SALVRTACAMRKRRRGAS-----TVTAAVPPFQCLSATERMQSFDDRRRAQVF-
Fes_sc0002823.1.g000004.aua.1      KVVIVMITSVHGRLKLSPEEGDLGEGEDKVGKETKHNELF
AtYSL5                               KVLRSITLGLFVQLRGPTTISRTSFTLEEDPH---ASPLSPKQSYDDQRRTFFF-
AtYSL8                               KVLIRITFGLISQIRGKAGSR--SSLAHKEDPPASPASPLTPRISYDDQRRTFFF-
OsYSL10                              KVMTRITLALVMQVRAMMSEP---TLPVSG---GGG---QTPEETFDDKRRTELF-
OsYSL13                              KMIIILAFSLRSQIKK-KNAS---TLPVSD--DGM-V-TTAAVSYDEERRNELF-
AtYSL7                               KVLGRIVFGLYKQFKN-K--D---VLPIND--HTS---TAPVTISYDDKRRTELF-
OsYSL11                              KVFGYTIKGFIVMYKN-KNSN---TLPISD--NGT-PANATEEESFDDKRRNELF-
OsYSL12                              KVLIRITAGFVVMKK-N--S---TLPVSN--NGS-PMVATEAISFDDERRTELF-
OsYSL14                              KVLIRITAGFISMVQN-NSKG---MLPVS--NGM-SMSTAEVVSFDDERRTEIF-
. . . . : : : * :

```

**Figura 21. Dominio de bucle variable en la familia de transportadores YSL.** Cada subgrupo de proteínas YSL se analizó por separado usando CLUSTAL OMEGA, con el fin de resaltar las regiones del dominio variable que se conservan entre las proteínas correspondientes a cada clado. El análisis incluyó los transportadores YSL de *Arabidopsis* (At), maíz (Zm), *Brachypodium distachyon* (Bd) y arroz (Os). Con asteriscos “\*” se indican las regiones que poseen un residuo totalmente conservado. Con doble punto “:” se indica la conservación entre residuos con propiedades fuertemente similares, con un solo punto “.” Se indica la conservación entre residuos con propiedades débilmente similares.

### 5.3.3 Secuencia del fragmento del gen *FeASA2*

En un inicio se diseñó el par de oligonucleótidos F-5' GCAGGAGACATATTTTCAGATCG y 3 R-5' ACWGGYAAWGCMGCACGYAG5 3' (degenerado), con el propósito de obtener un segmento de secuencia de alrededor de 653 pb, homólogo al correspondiente gen *AtASA1* (AT5G05730). Sin embargo, no fue posible la amplificación del fragmento de este gen, y se procedió de igual manera que con la secuencias de los genes anteriores. Se trazaron oligonucleótidos específicos sobre un boceto de secuencia ensamblada para el gen que codifica la subunidad alfa 1 de la enzima antranilato sintasa (*ASA1 $\alpha$* ) con los datos del archivo DRX007657, que corresponde con un ensayo de RNA-seq en raíces de *F. esculentum* (ver Anexo, figura 4 A).

Empleando los oligonucleótidos F-5' CAGATCGTGCTGAGTCAACGT3' y F5' AGAGTACCGCTCGATGTTTCATCA 3' (Tabla 5), se generó una secuencia de 375 pb (figura 22), la cual presentó una mayor homología con la secuencia correspondiente al gen *ASA2* (Antranilato sintasa subunidad alfa 2) de la planta *Pyrus x bretschneider* (Pera blanca china), con un 83 % de identidad entre secuencias. En las plantas superiores, la ruta biosintética del aminoácido esencial triptófano, produce varios metabolitos secundarios, incluyendo la hormona ácido indolacético (IAA). El IAA se sintetiza a partir de la misma vía del corismato al antranilato cuya síntesis es catalizada por la enzima antranilato sintasa (Radwanski & Last, 1995). La enzima antranilato sintasa funciona formando un heterocomplejo cuando se encuentran unidas la subunidad alfa con la subunidad beta (Poulsen *et al.*, 1993). La subunidad- $\alpha$  de la enzima ASA puede ser codificada por *ASA1* o *ASA2*, dos genes no alélicos aislados en *A. thaliana* (Niyogi & Fink, 1992). La secuencia parcial obtenida de *F. esculentum* mostró que posee una mayor identidad con *AtASA2* (75.20 %), que con *AtASA1* (70.67 %) (figura 23). En el genoma de *F. tartaricum*, se encuentra reportada una única secuencia homóloga a *AtASA2* (no existen secuencias que correspondan con *AtASA1*), con la que la secuencia parcial de *FeASA2* presenta 82.40 % de identidad. De igual forma, en la base de datos del genoma de *F. esculentum* no existe ninguna secuencia que presente

homología con *AtASA1*, sin embargo para *AtASA2* existen dos secuencias que coinciden en *F. esculentum* Fes\_sc0000040.1.g000015.aua.1 /f y Fes\_sc0002607.1.g000006.aua.1 (/f). De los alineamientos el fragmento de *FeASA* clonado, posee 96.80 % de identidad con Fes\_sc0002607.1.g000006.aua.1 (/f) y 82.13 % de identidad con Fes\_sc0000040.1.g000015.aua.1. De la descripción anterior, no queda duda que se logró clonar un fragmento parcial correspondiente con el gen *ASA2* de *F. esculentum*.

```
5'CAGATCGTGCTGAGTCAACGTTTTGAAAGGCGAACATTTGCAGACCCTTTTCAAATATACAGAGCTTTGAGAAT
TGTTAATCCAAGTCCGTATATGACTTACCTTCAGGCTAGGGGATGTATTCTAGTTGGCTCAAGTCCTGAAATCCTC
ACCCGTGTGAAAAAGGGCAAAGTCACCAATAGGCCCTTGGCTGGAACATCCGAAGAGGAAAGACTCCTAAAG
AAGATCTCATGTTGGAAGAGCAGCTTTTGAATGATGAAAAGCAAAGAGCAGAGCATATTATGCTCGTCGACCTA
GGAAGGAATGACGTTGAAAGGTCTCAAACCAGTTCTGTGAAAGTTGAAAAGCTGATGAACATCGAGCGGT
ACTCT3'
```

**Figura 22. Secuencia parcial (375 pb) del gen *FeASA2 $\alpha$* .** Las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos F-5'CAGATCGTGCTGAGTCAACGT3' y R-5'TGATGAACATCGAGCGGTACTCT3' se encuentran subrayadas.

```

AtASA1      ATATTTT CAGATCGT GCTGAGTCAACGTTTTGAGCGGCGAACATTTGCAGACCCCTTTGAA
FeASA2      -----CAGATCGT GCTGAGTCAACGTTTTGAAAGGCGAACATTTGCAGACCCCTTTGAA
AtASA2      ATCTTTT CAGATAGTTCTTAGTCAGAGATTTGAAAGGCGGACATTTGCGGACCCATTTGAG
              ***** ** * ***** * ***** ***** ***** *****
AtASA1      GTTTATAGAGCACTAAGAGTTGTGAATCCAAGTCCGTATATGGGTTATTTGCAGGTTGGT
FeASA2      ATATACAGAGCTTTGAGAATTGTTAATCCAAGTCCGTATATGACTTACCTTCAGGCTAGG
AtASA2      ATATATAGAGCTCTTAGGATTGTAATCCAAGTCCCTACATGGCCTATTTGCAGGTTAGA
              * ** ***** * ** **** ***** ***** ** *** ** * ***** *
AtASA1      GATGGAGAGAACATTTCTCAACAACCTTTGCATTTTGTACTTGTGGATAAACCATCAATGC
FeASA2      GGATGTATTCTAGTT-----
AtASA2      GGATGCATATTAGTT-----
              * *      **
AtASA1      TGTTCGTTCTGTTATTCAGGCTAGAGGATGCATTTTGGTAGCATCAAGTCCAGAAATT
FeASA2      -----GGCTCAAGTCCCTGAAATC
AtASA2      -----GCATCAAGTCCAGAGATA
              * ***** ** **
AtASA1      CTCACCAAAGTAAAGCAGAACAAGATAGTGAATCGGCCATTGGCAGGAACCAGCAAGAGA
FeASA2      CTCACCCGTGTGAAAAAGGGCAAAGTCACCAATAGGCCCTTGGCTGGAAGTATCCGAAGA
AtASA2      TTGTTACGTTCAAAAAATAGGAAAATTACCAATCGCCCCCTTGGCTGGAAGTGTGAGAAGA
              *          ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
AtASA1      GGAAGAATGAAGTTGAGGATAAGAGATTAGAAAAGGAACTGCTAGAGAATGAAAAGCAA
FeASA2      GGAAAGACTCCTAAAGAAGATCTCATGTTGGAAGAGCAGCTTTTGAATGATGAAAAGCAA
AtASA2      GGAAGACACCCAAAGAAGATCTAATGCTGGAAAAAGAGCTCTTAAGCGATGAAAAACAA
              ** ****          ** *** * * ** * * ** * ***** **
AtASA1      TGTGCTGAGCACATCATGTTGGTTGATCTCGGTCGCAACGATGTTGGAAAGGTTACGAAA
FeASA2      AGAGCAGAGCATATTATGCTCGTACCTAGGAAGGAATGACGTTGGAAAGGTCTCAAAA
AtASA2      TGCGCAGAACATATTATGCTTGTGATTTGGGAAGGAACGATGTTGGCAAGGTTTCAAAG
              * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

**Figura 23. Alineamiento de *FeASA2* conservados entre las secuencias de *AtASA1* y *AtASA2*. Los asteriscos indican la posición de los residuos**

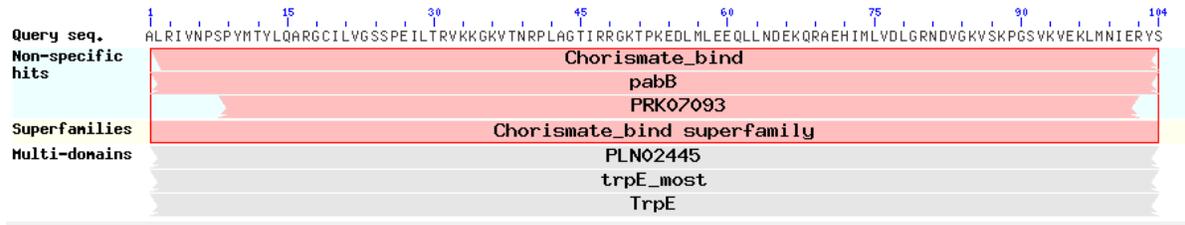
El transcrito de *FeASA2*, se tradujo *in silico* y se obtuvo la predicción proteica (figura 24 a), se observó que corresponde con los dominios (figura 24 b) que se enumeran a continuación: dominio de unión a corismato, pabB amino deoxicorismato sintetasa, PRK07093 para-aminobenzoato sintetasa componente 1, PLNO7093 antranilato sintasa componente 1, trpE antranilato sintasa componente 1 y TrpE antranilato

para-aminobenzoato sintetasa, todos ellos asociados con la enzima antranilato sintasa. Los alineamientos a nivel de proteína con esta secuencia (figura 24 c) mostraron que tiene identidad del 90.38 % con la subunidad 2  $\alpha$  de la enzima antranilato sintasa de *F. tartaricum* (comp29197\_c0\_seq1 RNA seq analysis), 91.35 % con ASA2 de *Beta vulgaris* (XP\_010685585.1), de 94.23 % con *Theobroma cacao* (XP\_008385069.1) y de 81.73 % con ASA2 de *A. thaliana* (AT2G29690). Por lo anterior, este fragmento parece coincidir mejor con el gen ASA2 que codifica para la subunidad alfa.

a)

ALRIVNPSPYMTYLQARGCILVGSSEILTRVKKGKVTNRPLAGTIRRGKTPKED  
LMLEEQLLNDEKQRAEHIMLVDLGRNDVGKVKSPGSKVSVKVEKLMNIERY S

b)



c)

```

Arabidopsis_thaliana_ASA2      ADPFEIYRALRIVNPSPYMAYLQVRGCIILVASPEILLRSKNRKITNRPLAGTVRRGKTP
Fagopyrum_tartaricum_ASA2     ADPFEIYRALRIVNPSPYMTYLQARGSILVASPEVLTRVKKGVVNRPLAGTIRRGKTP
Beta_vulgaris_ASA2            ADPFEAYRALRIVNPSPYMGYLQARGCILVASPEILTCVKKGKI TNRPLAGTIRRGKTP
Theobroma_cacao_ASA2         ADPFEIYRALRIVNPSPYMTYLQARGCILVASPEILTRVKKGKVTNRPLAGTIRRGKTP
FeASA2 $\alpha$                     -----ALRIVNPSPYMTYLQARGCILVGSSEILTRVKKGKVTNRPLAGTIRRGKTP
                               ***** **.*.***.***:* * :***** **:*
Arabidopsis_thaliana_ASA2      KEDLMLEKE LLSDEKQCAEHIMLVDLGRNDVGKVKSPGSKVSVKVEKLMNIERYSHVMHISST
Fagopyrum_tartaricum_ASA2     EEDLVLEEE LLKDEKQRAEHIMLVDLGRNDVGKVKSPGSKVSVKVEKLMNIERYSHVMHISST
Beta_vulgaris_ASA2            KEDYMLENQLLNDEKQCAEHIMLVDLGRNDVGKVKSPGSKVSVKVEKLMNIERYSHVMHISST
Theobroma_cacao_ASA2         KEDLMLEKE LLADEKQCAEHIMLVDLGRNDVGKVKSPGSKVSVKVEKLMNIERYSHVMHISST
FeASA2 $\alpha$                     KEDLMLEEQLLNDEKQRAEHIMLVDLGRNDVGKVKSPGSKVSVKVEKLMNIERY S-----
                               **: **: **: ***** **:* ** :* :*

```

**Figura 24. Análisis de la secuencia proteica de FeASA. a) Predicción de la secuencia proteica (104 aa) del gen FeASA2 usando el servidor ExPASy. b) Dominios conservados: de unión a corismato, pabB amino deoxicorismato sintetasa, PRK07093 para-aminobenzoato sintetasa componente 1, PLN07093 antranilato sintasa componente 1, trpE antranilato sintasa componente 1 y TrpE antranilato para-aminobenzoato sintetasa componente 1; y c) alineamiento de FeASA2 con secuencias proteicas de ASA2 en otras especies. Los asteriscos indican la posición de los residuos conservados entre secuencias, con puntos “.” se indica la conservación entre residuos con propiedades fuertemente similares.**

Los diferentes genes que codifican para la subunidad alfa de ASA parecen estar sujetos a distintos mecanismos de regulación transcripcional. En *A. thaliana* *ASA1* se induce por heridas y por infección bacteriana, mientras que el mensajero de *ASA2* está presente en pequeñas cantidades, no responde a estos estímulos y se ha determinado su expresión como constitutiva a nivel basal. De manera similar, la abundancia del transcrito de *ASA1* de *Ruta graveolens* aumenta en un factor de 100 en respuesta al tratamiento por infección con hongos, mientras que los niveles transcripcionales de *ASA2* no se ven afectados y el gen es expresado constitutivamente (Niyogi & Fink, 1992). En el análisis de los datos procedentes de los microarreglos realizado con muestras de raíces de *Fagopyrum*, el gen *ASA1* mostró una señal de inducción a las 24 h por Al, Cu y Zn; mientras que a las 48 h sólo por Cu y Zn.

#### 5.3.4 Secuencia del fragmento del gen *FeZEP*

Al igual que para los anteriores genes, el ensamble de secuencias de datos de RNAseq permitió generar un boceto del gen *ZEP* de *Fagopyrum* (745 pb) (ver Anexo, figura 5), sobre el cual se diseñaron diversos pares de oligonucleótidos. Empleando los cebadores (F 5' TGTCATGCTATGCAGCCAAACAT 3' y R' 5' GCATGCTTTTCCGAAACCTGA 3') para el transcrito de *ZEP*, se obtuvo la secuencia nucleotídica parcial de 630 pb (figura 25 a). A partir de la predicción proteica (figura 25 b), se observó que la región clonada corresponde con el dominio PLN02927 (figura 25 c) cuya función está directamente involucrada en la epoxidación de la zeaxantina. Los alineamientos con esta secuencia (figura D) mostraron que tiene identidad cercana con la enzima zeaxantina epoxidasa de *F. tartaricum* (96.57 %, comp19716\_c0\_seq3 RNA seq analysis), *Vitis vinifera* (78.33%, AAR11195.1), *Ricinus communis* (75.98%, XP\_002523587.1), *Dianthus caryophyllus* (71.57%, BAN15741.1), *Beta vulgaris* (69.12 %, XP\_010666612.1) y *A. thaliana* (68.63 %, AT5G67030). Además, se realizó un alineamiento con la proteína *ZEP* determinada para *F. esculentum* en un trabajo realizado con el transcriptoma floral de la planta en el 2011 por Logacheva y colaboradores, el alineamiento mostró un 99 % de identidad entre ambas secuencias. En la base de datos BGDB, dos secuencias coinciden con el ID del gen *ZEP* de *A. thaliana*:

Fes\_sc0004040.1.g000005.aua.1 y Fes\_sc0006590.1.g000009.aua, la región clonada de *FeZEP* resultó 100 % idéntico a la secuencia Fes\_sc0004040.1.g000005.aua.1 y 78.44 % a Fes\_sc0006590.1.g000009.aua.1.

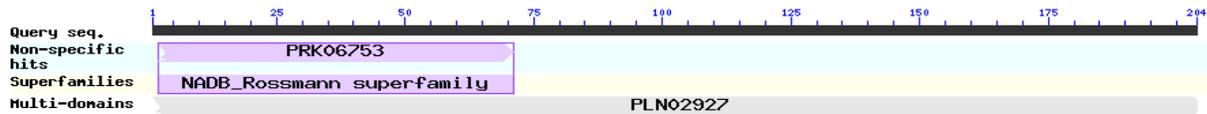
a)

5'TGTCCATGCTATGCAGCCAAACATGGGTCAAGGGGGTTGCATGGCAATCGAGGATGGCTACCAACTTGCTTTGGAGCTCGATAAAGCTTGGGAAGATAGTGTGCAAATGGAAAGCCTATTGACATTGTTTCTTCTCTTAAGAGTTATGAGAAAGCTAGAAGACTCCGGGTGGCCGTGATTCACGGAATGGCAAGAATGGCAGCAATAATGGCATCAACTACAAGGCATATTTAGGTGTTGGACTTGGTCCATTGTCGTTCTGACAAATTTGAGGATACCACATCCAGGGAGAGTTGGTGGGAGATTTTTCATTGATCAAGCGATGCCTCCAATGCTTAGCTGGGTTTTGGGTGGTAACAGCTCAAACCTTGAAGGAAGCCCCCAGCGTGCAGACTCTCAGACAGAGCAAGTGATCAACTAAAGACATGGTTTGAAGATGACTATGCCCTAGAGCGTGTATAAATGGAGAGTGGTACCTTCTCCACAGGGAACTCTACAGGTGTGGCACCTATTGTTTATCCGAGAAGAAGACAAAGTTTACCTATTGGGAGCATAGCTAGTGAAGATTCTCCAGGATCATCCATCGTGCTGCCTTATCCTTCAGGTTTCGGAAAAGCATGC3'

b)

VHAMQPNMGQGGCMAIEDGYQLALELDKAWEDSVANGKPIDIVSSLKSYEKARRLRVAVIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGPLSFLTNLRIPHPGRVGRFFIDQAMPMLSWVLGGNSSNLEGRPPACRLSDRASDQLKTFWEDDYALERAINGEWYLLPQG NSTGVAPICLIREEDKVYLIGSIASEDSPGSSIVLPYPQVSEKH

c)



d)

Arabidopsis_thaliana_ZEP	TEEEAILRRDIYDRSPGFTWKGGRVTLIGDSIHAMQPNMGQGGCMAIEDSYQLALELDEA
Dianthus_caryophyllus_ZEP	TDEDAILRRDIYDRTPSNWKGGRVTLIGDSIHAMQPNMGQGGCMAIEDSYQLALELDEA
Beta_vulgaris_ZEP	TDEEAILRRDIYDRTPKFTWGEGRITLLGDSVHAMQPNMGQGGCMAIEDSYELARSLKA
Vitis_vinifera_ZEP	TDEEAILRRDIYDRTPFTTWGGRVTLIGDSVHAMQPNMGQGGCMAIEDSYQLALELDEA
Ricinus_communis_ZEP	TDEDAILRRDIYDRTPFTWKGGRVTLIGDSIHAMQPNMGQGGCMAIEDSYQLALELDEA
Fagopyrum_esculentum_floral_transcriptome	-----YDRTPINWKGGRVTLIGDSVHAMQPNMGQGGCMAIEDGYQLALELDEA
<i>FeZEP</i>	-----VHAMQPNMGQGGCMAIEDGYQLALELDEA
Fagopyrum_tartaricum_ZEP	TEEEAILRRDIYDRIPINWKGGRVTLIGDSVHAMQPNMGQGGCMAIEDSYQLALELDEA
	*****
Arabidopsis_thaliana_ZEP	WKQSVETITPVDVVSLLKRYEESRRRLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
Dianthus_caryophyllus_ZEP	WNKSVESGTPVDVVSLLRSYEGSRKRLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
Beta_vulgaris_ZEP	WQTSVESGKTPVDVVSLLRSYERARLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
Vitis_vinifera_ZEP	WEQSIKSGTPIDVVSLLKSYEKARRLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
Ricinus_communis_ZEP	WKQSIESGTPVDVVSLLKRYERTRRRLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
Fagopyrum_esculentum_floral_transcriptome	WEDSVANGKPIDIVSSLKSYEKARRLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
<i>FeZEP</i>	WEDSVANGKPIDIVSSLKSYEKARRLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
Fagopyrum_tartaricum_ZEP	WEDSVATGKPIDVVSLLKSYEKARRLRVAIIHGMARMAAIMASTYKAYLGVGLGFLSFLT
	*****
Arabidopsis_thaliana_ZEP	KFRVPHPGRVGGRFFVDIAMPMLSWVLGGNSSNLEGRPPACRLSDRASDQLKTFWEDDY
Dianthus_caryophyllus_ZEP	KFRIPHPGRVGRVFTSQAMPMLSWVLGGNSSNLEGRTPCRLSERASTQLQRWFEDDD
Beta_vulgaris_ZEP	KFKIPHPGRVGRVFTSPAMPMLSWVLGGNSSNLEGRVPHCRLEKANNQLRRWFEDDD
Vitis_vinifera_ZEP	KLRIPHPGRVGRFFDIAMPMLSWVLGGNSSNLEGRPPCRLSDKANDQLRRWFEDDD
Ricinus_communis_ZEP	KFRIPHPGRVGRFFVDIAMPMLSWVLGGNSSNLEGRPPACRLSDRASDQLKTFWEDDY
Fagopyrum_esculentum_floral_transcriptome	KFEDTTSRESWWEIFTDQAMPMLSWVLGGNSSNLEGRPPACRLSDRASDQLKTFWEDDY
<i>FeZEP</i>	MTDTHDSDVGGDFFTDQAMPMLSWVLGGNSSNLEGRPPACRLSDRASDQLKTFWEDDY

**Figura 25. Secuencia parcial del gen *FeZEP* (630 pb).** a) secuencia nucleotídica. b) Predicción de la secuencia proteica (204 aa) del gen *FeZEP* usando el servidor ExPASy. c) Dominios conservados PLN02927 anteraxantina epoxidasa/zeaxantina epoxidasa. d) alineamiento de *FeZEP* con secuencias proteicas de ZEP en otras especies.

Estudios en *A. thaliana* han permitido determinar que la raíz de plantas contiene las enzimas para la síntesis *de novo* de ABA, entre estas enzimas se encuentran isoformas (específicas de raíz) de la proteína fitoeno sintasa (PSY) encargada de realizar el primer paso en la vía de síntesis de  $\beta$ -caroteno, así como también se tienen las enzimas  $\beta$ -caroteno hidroxilasas (BCH1) y la enzima zeaxantina epoxidasa. De estos trabajos se ha observado que en raíces de *A. thaliana*, los transcritos de los genes PSY, BCH1 y ZEP son inducidos por un aumento en la concentración de sales (NaCl) en el medio (Ruiz-Sola *et al.*, 2014). Los datos de microarreglos de raíces de *F. esculentum* a las 24 h de exposición a los metales Al, Cu y Zn, revela que el gen *FeZEP* es inducido por estos metales.

#### 5.4 Expresión por PCR semi-cuantitativa de los genes

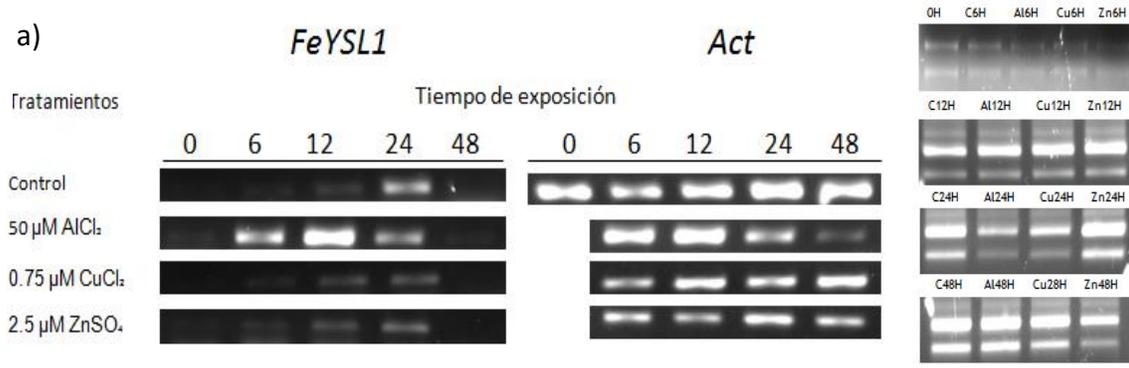
El estudio de transcriptomas por microarreglos de raíces de *F. esculentum* mostró cambios, con respecto al control, en la expresión de genes en respuesta a las 24 y 48 h a los metales Al, Cu y Zn. La medida de la expresión génica por la técnica de PCR convencional proporcionó datos cualitativos, que son útiles para tener una buena referencia para la estandarización de la técnica bajo las condiciones experimentales señaladas en este trabajo.

En éste trabajo se clonaron cuatro genes en total, únicamente los genes *FeYSL1* y *FeZEP1* fueron seleccionados a partir del estudio de la expresión en el microarreglo a las 24 h. Debido a dificultades en la estandarización de la técnica, sólo fue posible realizar las pruebas de expresión con los genes *FeYSL1*, *FeYSL3* y *ASA2 $\alpha$*  utilizando muestras pertenecientes a tres réplicas biológicas, sin embargo los resultados no fueron comparables entre réplicas, por lo que no se realizó un análisis estadístico. Los resultados que se muestran a continuación corresponden sólo a una de las réplicas, a pesar de esto, los resultados se discuten de acuerdo a la significancia de los mismos con relación al objetivo.

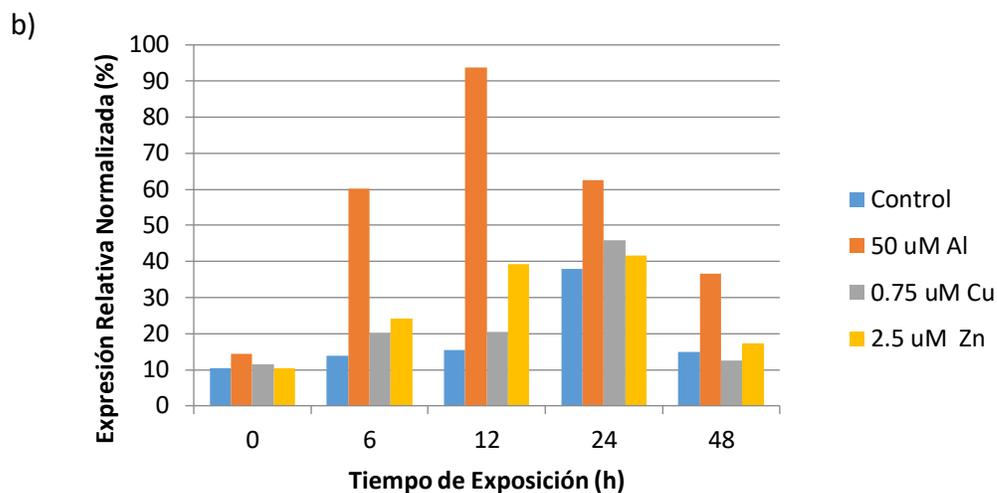
El objetivo principal del estudio por PCR semicuantitativa, fue el de validar la expresión del gen *FeYSL1* en el microarreglo a las 24 y 48 h. En este estudio también se evaluó la expresión en tiempos menores a las 24 y 48 h, a fin de observar de qué manera se podía comportar la expresión de este gen y asociarlo a una respuesta fisiológica.

#### 5.4.1 Expresión del gen *FeYSL1*

En la figura 27 a se muestra el resultado del análisis de expresión por PCR-semicuantitativa del gen *FeYSL1*, en puntas de raíces ( $\approx 1$  cm) de plántulas de *Fagopyrum*. Las pruebas de expresión se realizaron empleando los oligonucleótidos F-5'ATGGACCGAGCAGATCACGTTA 3' y R-5'ACACCAGCTAACTCATAAGTCTTCTT 3' (Tabla 5) y la enzima TaqPolimerasa (Invitrogen) para la amplificación. Los resultados de expresión se evaluaron a partir de la medición de densitometrías, con lo cual se calculó el valor de la expresión relativa normalizada (ERN) del gen *FeYSL1* en cada condición. En la figura 25 B se observa que en las condiciones control, Cu y Zn, la expresión relativa normalizada del gen *FeYSL1* aumenta en los tiempos de 0 a 24 h y disminuye a las 48 h. En el tratamiento con Al, la expresión del gen *FeYSL1* mostró un pico de inducción a las 12 h que decae posteriormente a las 24 y a las 48 h (figura 25 B). En la tabla 6 se muestran los datos de valores de cambio, donde la condición con Al (valor de cambio = 1.64) mostró el valor más alto de inducción. Estos resultados de expresión semicuantitativa confirman que el gen *FeYSL1* se induce en raíces de *F. esculentum* tratadas con Al, Cu y Zn. A diferencia de lo observado con el análisis por microarreglos, en donde la condición con Cu fue la que mostró una mayor expresión del gen, en el PCR semicuantitativo fue el Al el que mostró una mayor inducción. Como se mencionó anteriormente, estos resultados no son concluyentes, ya que no se tiene una validación estadística.



***FeYSL1***  
***FeYSL1***



**Figura 26. Análisis de expresión del gen *FeYSL1* en puntas de raíz ( $\approx 1$ cm) expuestas durante 0, 6, 12, 24 y 48 h a los tratamientos control, 50  $\mu$ M Al, 0.75  $\mu$ M Cu y 2.5  $\mu$ M Zn. a) Geles de corrida para *FeYSL1*, Actina, bandas 28 y 18 S de rRNA. b) Expresión relativa normalizada del gen *FeYSL1* con respecto al gen de referencia. El resultado corresponde al experimento realizado con una réplica biológica.**

**Tabla 6. Medidas de la densitometría (Densidad integrada) de las bandas en los geles de corrida. Expresión relativa normalizada y % de cambio con respecto al valor de la condición control.**

Tratamientos	Densidad integrada Act	Densidad integrada <i>FeYSL1</i>	Expresión Relativa Normalizada (ERN)	Valor de cambio
Control				
0	107558	11234	10.44459733	
6	80300	11038	13.74595268	
12	98627	15148	15.35887739	
24	119273	45175	37.87529449	
48	110981	16534	14.89804561	
50 $\mu$ M Al				
0	107558	15402	14.31971587	
6	99309	59606	60.02074334	4.366430232
12	109568	102848	93.86682243	6.111567927
24	62719	39183	62.47389148	1.649462858
48	27611	12497	45.26094672	3.038045923
0.75 $\mu$ M Cu				
0	107558	12340	11.47287975	
6	44343	8911	20.09561825	1.461929829
12	69124	14119	20.42561194	1.329889642
24	58525	26860	45.8949167	1.211737554
48	75144	9422	12.53859257	.8416266735
2.5 $\mu$ M Zn				
0	107558	11166	10.38137563	
6	57067	13736	24.06995286	1.751057451
12	43406	17005	39.17661153	2.550747072
24	66545	27670	41.58088512	1.097836615
48	49547	8611	17.37945789	1.166559584

Se ha reportado que miembros de la familia de proteínas YSL son encargados de transportar diversos metales en complejos con nicotianamina en plantas. La nicotianamina es un precursor en la vía de síntesis de los fitosideróforos derivados del ácido mugineico, y a diferencia de estos la nicotianamina se encuentra en todas las plantas y no es exudada en la rizosfera. A partir de valoraciones potenciométricas en soluciones con diferencias de acidez (pH 5.5 – 7), se ha reportado que la nicotianamina forma complejos estables con los metales Fe (II), Cu (II) y Zn (II), mientras que no puede formar complejos con el Al (III) (Yoshimura *et al.*, 2011). En plantas de arroz y *A. thalina*, se propone que la nicotianamina forma complejos estables con Fe (II)-NA a pH 7 (Grillet *et al.*, 2014; Conte & Walker, 2011)

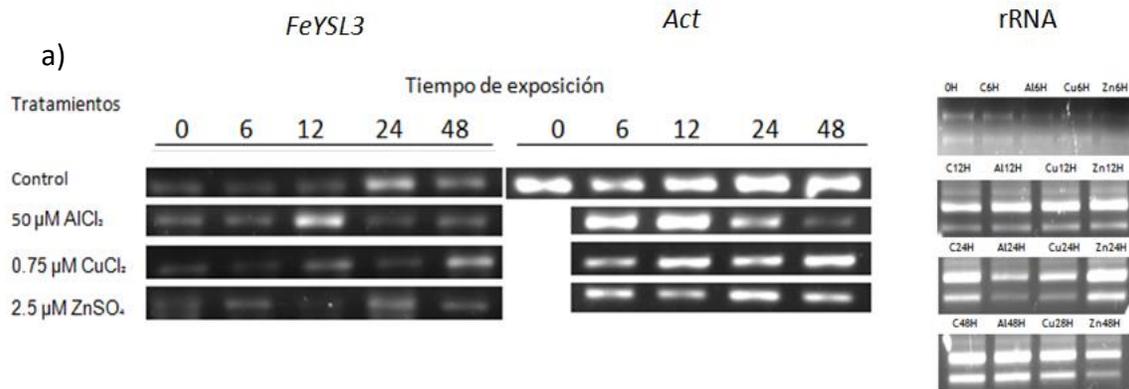
En un análisis transcripcional realizado en dos líneas isogénicas cercanas de plantas de trigo, con diferencias en su tolerancia a aluminio, se observó la inducción del gen *YSL1* (*YELLOW STRIPE LIKE 1*) en raíces, después de 15 min y 1 h de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  en la línea isogénica sensible Chilsholm. Los autores proponen que el incremento de la expresión del gen *YSL1* en ésta línea sensible, se debe a una deficiencia de Fe, y por lo tanto, el aumento en la expresión de *YSL1* puede ser un mecanismo para la regulación de la absorción y el transporte de hierro durante el estrés por Al (Guo *et al.*, 2007). En raíces de plantas de *F. esculentum* a las 6, 12, 24 y 48 h de exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  se observó la inducción del gen *YSL1* (Tabla 6) en estas condiciones, y por los reportes mencionados anteriormente en plantas de trigo, se sugiere que en plantas de *Fagopyrum* el estrés por Al, podría ocasionar, a estos tiempos tempranos de exposición, una deficiencia de Fe, y por lo cual, la planta busca movilizarlo usando el transportador YSL1, sin embargo haría falta realizar estudios para conocer si efectivamente este transportador moviliza hierro en *Fagopyrum*.

Así mismo, al igual que para el Al, un exceso de los metales Cu y Zn, provoca una deficiencia de hierro en plantas, debido a que presentan un radio atómico similar y la misma carga, desplazando al hierro al ser transportados preferencialmente en lugar de este metal (Liphadzi & Kirkham, 2006). Los resultados obtenidos del análisis de expresión del gen *YSL1* en raíces de *F. esculentum* expuestas durante 6 y 12 h

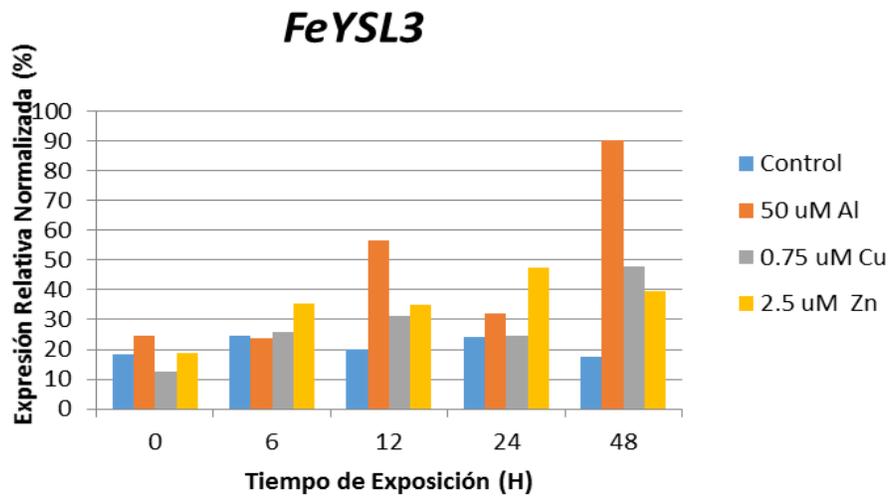
a una concentración de 2.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , mostraron la inducción de la expresión de este gen (Tabla 6), lo cual podría sugerir que la transcripción del *FeYSL1* es un proceso regulado por la presencia de Zn, cuyo producto proteico podría estar involucrado en mantener la homeostasis de Zn o Fe, sin embargo, como se mencionó, es necesario validar los resultados de expresión del gen *FeYSL1* y realizar análisis funcionales como la complementación de *FeYSL1* en mutantes de *Arabidopsis thaliana atyls1/atyls3* y evaluar la movilización de hierro en la planta.

#### 5.4.2 Expresión del gen *FeYSL3*

Debido a que en un principio se logró la amplificación y secuenciación del gen *FeYSL3* cuya proteína se asocia al transporte de complejos NA-metal al igual que YSL1; se procedió a evaluar el comportamiento de este gen en diferentes tiempos de exposición a Al, Cu o Zn en puntas de raíces de *F. esculentum*. En la figura 26 A se muestra el resultado de la expresión del gen *FeYSL3* usando los oligonucleótidos F5' TACTTTTGGATTGCAGGCTTGGA3' y R-5'TAACCATTGAGACTTTTCATACTGCT3' (Tabla 4), que corresponden a la segunda secuencia parcial de *FeYSL3* determinada en este trabajo. Del análisis de la expresión relativa normalizada (figura 28 b), se observó que en la condición con Al hubo una inducción a las 12 h, la cual disminuyó a las 24 h y a las 48 h se observó un aumento. En la condición con Cu la expresión a las 6 y 12 h incrementó, a las 24 h se mantuvo y a las 48 h mostró un pico de inducción. En la condición con Zn, se observó un resultado similar, el valor mayor de expresión se encontró a las 24 h. Los valores de cambio entre las condiciones con respecto al control (Tabla 7) fueron los siguientes: 1.33 para la condición con Al, 1.03 para la condición con Cu y 2.7 en la condición con Zn.



b)



**Figura 27.** Análisis de expresión del gen *FeYSL3* en puntas de raíz ( $\approx 1$ cm) expuestas durante 0, 6, 12, 24 y 48 h a los tratamientos control, 50  $\mu$ M Al, 0.75  $\mu$ M Cu y 2.5  $\mu$ M Zn. a) Geles de corrida para *FeYSL3*, Actina, bandas 28 y 18 S de rRNA. b) Expresión relativa normalizada del gen *FeYSL3* con respecto al gen de referencia. El resultado corresponde al experimento realizado con una réplica biológica.

**Tabla 7. Medidas de la densitometría (Densidad integrada) de las bandas en los geles de corrida.**

Tratamientos	Densidad integrada Actina	Densidad Integrada FeYSL3	Expresión Relativa Normalizada (ERN)	Valor de cambio
Control				
0	107558	19611	18.23295338	
6	80300	19611	24.42216687	
12	98627	19611	19.88400742	
24	119273	28611	23.98782625	
48	110981	19611	17.67059226	
50 $\mu$ M Al				
0	107558	26617	24.74664832	
6	99309	23537	23.70077234	0.9704614852
12	109568	61999	56.58495181	2.845751895
24	62719	20018	31.91696296	1.330548364
48	27611	24941	90.32994097	5.111879648
0.75 $\mu$ M Cu				
0	107558	13640	12.68152997	
6	44343	11409	25.72897639	1.053509155
12	69124	21476	31.06880389	1.562502127
24	58525	14498	24.77231952	1.032703808
48	75144	35862	47.72436921	2.700779266
2.5 $\mu$ M Zn				
0	107558	20063	18.65319177	
6	57067	20162	35.33040111	1.446653005
12	43406	15242	35.11496107	1.765990141
24	66545	31650	47.56180029	1.982747407
48	49547	19601	39.56041738	2.238771445

En trabajos realizados con plantas de *A. thaliana*, se ha determinado por estudios de transcriptomas a lo largo de su ciclo de vida, que el gen *YSL3* es expresado principalmente en la células de la endodermis de la raíz primaria, en la zona de la elongación (0.5 a 1 cm desde la base de la raíz) (Schmid *et al.*, 2005). En estudios de líneas de dobles mutantes *ysl1ysl3* de *A. thaliana*, se observó la reducción en la fertilidad

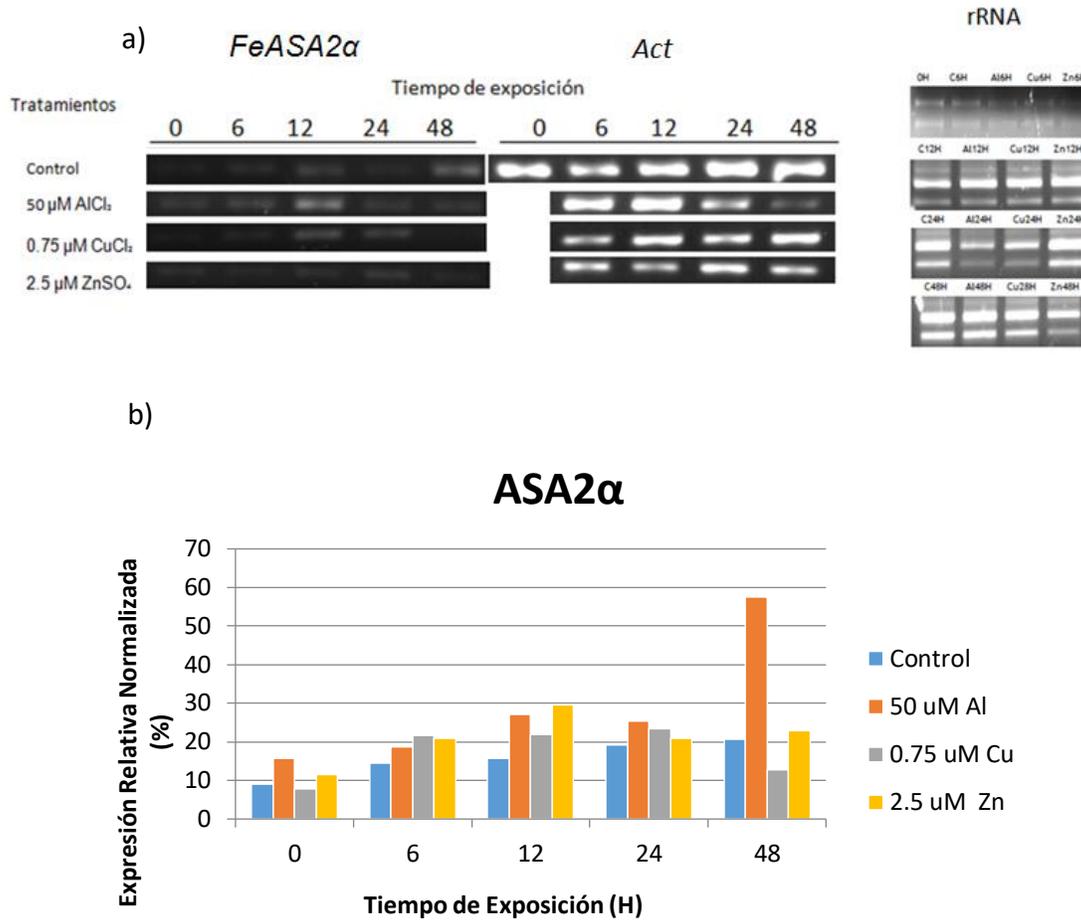
y desarrollo de embriones. Estos resultados junto con el aumento de *AtYSL1* y *AtYSL3* durante la senescencia en las hojas, revelaron el papel de *AtYSL1* y *AtYSL3* en la movilización del hierro en la senescencia de hojas y en el desarrollo de semillas (Waters *et al.*, 2006).

En el análisis de expresión por PCR semicuantitativa en puntas de raíces de *F. esculentum*, se observó que el gen *FeYSL3* se indujo por Zn a las 24 h y por los tres metales, Al, Cu y Zn, a las 12 y 48 h (Tabla 7); con base en los reportes mencionados anteriormente para *YSL1* y sobre la posible función de los transportadores *YSL* en general, se podría sugerir que la inducción de este gen en las condiciones señaladas, se debe a que el estrés por los metales Al, Cu y Zn, en *F. esculentum* es percibido como una deficiencia de hierro, lo cual activa la expresión de los genes *YSL1* y *YSL3* en raíces, y su producto proteico puede estar involucrado en el transporte de Fe desde la raíz hacia los brotes por el floema, lo que permitiría regular la homeostasis de este metal. Además de esto, sería útil la caracterización funcional de ambos transportadores, a partir de análisis con dobles mutantes knockout de *ysl1/ysl3* en *F. esculentum* y mutantes individuales en el gen *YSL1* y *YSL3*, además de la medición de los niveles de hierro en la planta, para así poder proponer el papel que cada uno tiene durante la respuesta de adaptación a los metales Al, Cu y Zn en *F. esculentum*.

#### 5.4.3 Expresión del gen *FeASA2 $\alpha$*

Finalmente se evaluó la expresión del gen *FeASA2 $\alpha$*  con el objeto de conocer su comportamiento a diferentes tiempos de exposición a los metales. En la figura 29 a se muestra el resultado de la expresión del gen *FeASA2 $\alpha$*  usando los cebadores F-5'TGAAATCCTCACCCGTGTGAAGA 3' y R-5'ACAGGCAATGCAGCTCGCAA 3' (Tabla 5). Del análisis de la expresión relativa normalizada (figura 29 b), se observó que la expresión del gen en la condición control cambió muy poco con respecto al tiempo, sin embargo su expresión es creciente desde las 0 a las 48 h. En la condición con Al el patrón es similar, sin embargo a las 48 h se observó una mayor inducción en comparación a los otros tiempos. En la

condición con Cu se observó una inducción desde las 0 a las 6 h de tratamiento, que se mantuvo constante hasta las 24 h, y se redujo a las 48 h. En la condición con Zn se observó un comportamiento parecido a la condición con Cu, sin embargo, a las 12 h se observó una expresión mayor en comparación a los tiempos anteriores, que disminuyó a las 24 h y se mantuvo a las 48 h. Ya que no fue posible obtener el gen *ASA1 $\alpha$*  como tal, sino que se obtuvo el gen *ASA2 $\alpha$* ; se examinaron los datos del microarreglo nuevamente a las 24 y 48 h con el ID correspondiente a *A. thaliana*, de esto se obtuvo que el gen *ASA2 $\alpha$*  no mostró inducción. Comparando estos resultados con los obtenidos por PCR semicuantitativa, se tiene que el valor de cambio con respecto al control a las 24 h (Tabla 8) con Al es de 1.33, con Cu es de 1.23 y con Zn es de 1.09. A las 48 h los valores de cambio (Tabla 8) son los siguientes: 2.76, 0.61 y 1.10 respectivamente para Al, Cu y Zn. Los resultados anteriores indican que únicamente la exposición durante 48 h con Al incrementa la expresión del gen *FeASA2 $\alpha$* , lo cual no coincide con lo obtenido en el microarreglo tanto para el gen *ASA1 $\alpha$*  como para el gen *ASA2 $\alpha$* .



**Figura 28.** Análisis de expresión del gen *FeASA2 $\alpha$*  en puntas de raíz ( $\approx$ 1cm) expuestas durante 0, 6, 12, 24 y 48 h a los tratamientos control, 50  $\mu$ M Al, 0.75  $\mu$ M Cu y 2.5  $\mu$ M Zn. **a)** Geles de corrida para *FeASA2 $\alpha$* , Actina, bandas 28 y 18 S de rRNA. **b)** Expresión relativa normalizada del gen *FeASA2 $\alpha$*  con respecto al gen de referencia. El resultado corresponde al experimento realizado con una única réplica biológica.

**Tabla 8. Medidas de la densitometría (Densidad integrada) de las bandas en los geles de corrida. Expresión relativa normalizada y del % de cambio con respecto al valor de la condición control.**

Tratamientos	Densidad integrada Act	Densidad integrada <i>FeASA2</i>	Expresión Relativa Normalizada (ERN)	Valor de cambio
Control				
0	107558	9799	9.110433441	
6	80300	11615	14.46450809	
12	98627	15468	15.68333215	
24	119273	22779	19.09820328	
48	110981	23032	20.75310188	
<b>50 <math>\mu</math>M Al</b>				
0	107558	16917	15.72825824	
6	99309	18540	18.66900281	1.290676647
12	109568	29691	27.09824036	1.727836923
24	62719	15956	25.44045664	1.332086389
48	27611	15864	57.45536199	2.76519247
<b>0.75 <math>\mu</math>M Cu</b>				
0	107558	8360	7.772550624	
6	44343	9625	21.70579347	1.500624379
12	69124	15145	21.90990105	1.397018238
24	58525	13750	23.49423323	1.230180289
48	75144	9596	12.77014798	0.6153368328
<b>2.5 <math>\mu</math>M Zn</b>				
0	107558	12500	11.6216367	
6	57067	11920	20.88772846	1.444067667
12	43406	12828	29.55351795	1.884390234
24	66545	13871	20.84454129	1.091439911
48	49547	11312	22.83084748	1.100117351

En plantas de *A. thaliana* el gen *ASA2* (*ANTHRANILATE SYNTHASE 2*) codifica para la subunidad alfa de la enzima antranilato sintasa, implicada en el paso limitante de la síntesis de ácido indol acético (IAA) por la vía dependiente de triptófano. El gen *AtASA2* se expresa constitutivamente a nivel basal en carpelos,

cotiledones, pedicelos de flores, células guarda, hipocótilos, meristemas de inflorescencia, ápices de hojas, lámina basal de hojas, pétalos, peciolo, embriones, raíces, semillas, sépalos y en el sistema vascular de la hoja (Schmid *et al.*, 2005). Se ha observado que el gen *AtASA2* no cambia su expresión en la raíz al exponer plantas de *A. thaliana* a diferentes tipos de estrés abiótico (estrés por frío, osmótico, salino, oxidativo, UV-B, estrés mecánico y estrés por calor) por 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h (Kilian *et al.*, 2007).

Por otro lado, se tienen referencias que el IAA junto con la hormona etileno se acumulan en la raíz en respuesta a metales como el Al. Estas hormonas participan regulando la morfología de la raíz, inhibiendo la elongación del meristemo primario e induciendo la proliferación de raíces laterales (Kopittke, 2016).

Los resultados del análisis de expresión de genes por PCR-semicuantitativa en puntas de raíces de *Fagopyrum*, mostraron un aumento de la transcripción del gen *FeASA2* a las 12 h en las condiciones con Al y Zn (Tabla 8), además de un aumento a las 48 h en la condición con Al. Como se mencionó en el apartado 5.3.3, en *Fagopyrum* existe un solo gen para codificar la subunidad alfa de la enzima antranilato sintasa, con todo lo anterior podría sugerirse que la expresión del transcrito de *FeASA2* es regulada en presencia de los metales Al y Zn, cuyo producto proteico puede participar en la vía de síntesis del IAA; sin embargo, habría que validar los resultados de expresión además de realizar mediciones de la actividad de la enzima antranilato sintasa y de los niveles de IAA.

## 6. Conclusiones y consideraciones finales.

De acuerdo a lo obtenido en el microarreglo, 264 y 51 genes fueron inducidos en común a los metales Al, Cu y Zn en raíces de *Fagopyrum esculentum* a las 24 y 48 h de tratamiento respectivamente. Lo anterior muestra que la respuesta general de *Fagopyrum* a los metales a las 24 h es mayor, en comparación con la respuesta a las 48 h, que se vuelve más específica.

La categorización funcional de los 264 genes que representan la respuesta general a los metales a las 24 h, reveló genes de defensa, relacionados a la regulación de la homeostasis de Ca, del transporte de metales (ZIP, YSL y ABC), de la síntesis de hormonas (IAA y ABA), de la respuesta antioxidante, y de la respuesta al estrés biótico y abiótico en general.

El análisis de los 51 genes sobreexpresados en común en la respuesta específica de los metales a las 48 h reveló genes del metabolismo de hormonas citocininas, del Ácido Jasmónico y Acido Salicílico, del transporte de metales (NRAMP), de respuesta al estrés abiótico, señalización en plasmodesmos y de la percepción de brasinoesteroides.

Se tienen las clonas de cuatro de ellos en *Fagopyrum*: el gen *FeYSL1* y dos formas no alélicas del gen *FeYSL3* (genes relacionados con el transporte de metales), y dos genes relacionados con la señalización del estrés y la síntesis de hormonas: auxinas (*ASA2*) y ácido abscísico (*ZEP*).

Con estos datos se pueden realizar análisis posteriores de expresión sensibles como PCR-tiempo real, empleando las secuencias caracterizadas, así como también realizar análisis a nivel proteico e ir construyendo la red de respuesta a los metales en *F. esculentum*.

## 7. Referencias

Agri-Facts Practical Information for Alberta's Agriculture Industry. (2001). Common Buckwheat. *Agri-Facts Practical Information for Alberta's Agriculture Industry*, 1-4.

Alloway, B. J. (2013). Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils. En: B. J. Alloway (Ed). *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*, Environmental Pollution. Springer Science+Business Media Dordrecht. 11-50 p.

Azpilicueta, C., Pena, I., & Gallego, S. (2010). Los metales y las plantas: entre la nutrición y la toxicidad. *NDSU Agriculture Communication*, 20: 9-16.

BLACKSMITH INSTITUTE. (2012). *The World's Worst Pollution Problems: Assessing Health Risks at Hazardous Waste sites*. Recuperado el 13 de Octubre de 2013, de sito web Worst Polluted: [www.worstpolluted.org](http://www.worstpolluted.org).

Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I., & Neumann, D. (1990). Heavy Metal Tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 154 (4), 536-546.

Brown, T., Idoine, N., Raycraft, E. R., Shaw, R., Deady, E. A., Rippingale, T. Bide, C. E. Wrighton, J. Rodley. (2014). World Mineral Production 2008-12. BRITISH GEOLOGICAL SURVEY. 2012. World mineral production 2008-12.(Keyworth, Nottingham: British Geological Survey).

Campbell, C. G. (1997). Ecology. En: C. G. Campbell, *Buckwheat Fagopyrum esculentun Moench*. Italia, Roma: International Plant Genetic Resources Institute. p 53.

Chaudhry, T. M., Hayes, W. J., Khan, A. G., & Khoo, C. S. (1998). Phytoremediation - Focusing on accumulator plants that remediate metal-contaminated soils. *Australasian Journal Ecotoxicology* 4, 37-51.

Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212 (4), 475-486.

Conte, S. S., & Walker, E. L. (2012). Genetic and Biochemical Approaches for Studying the Yellow Stripe-Like Transporter Family in Plants. *Current Topics in Membranes* 69, 295-322.

Conte, S., & Walker, E. L. (2011). Transporters Contributing to Iron Trafficking in Plants. *Molecular Plant* 4 (3), 464-476.

Delhaize, E., Ryan, P. R., & Randall, P. J. (1993). Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.)(II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices). *Plant Physiology* 103, 695-702.

Delphine, G., Pierre, C., Genevieve, v. C., Pianelli, K., Briat, J.-F., Lebrun, M., y otros. (2006). TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *The Plant Journal* 49, 1-15.

DiDonato, R., Roberts, L., Sanderson, T., Eisley, R., & Walker, E. (2004). *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *The Plant Journal* 39, 403-414.

Diez-Lázaro, & Diez, J. (2008). *Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas*. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela:

Dubey, S., Shri, M., Misra, P., Lakhwani, D., Kumar Bag, S., Asif, M. H., et al. (2014). Heavy metals induce oxidative stress and genome-wide modulation in transcriptome of rice root. *Functional & Integrative Genomics* 14 (2), 401-417

Grillet, L., Louis, S., & Schmidt, W. (2014). Iron in seeds – loading pathways and subcellular localization. *Plant Science* 4 , 1 - 5.

Groenenberg, J.E.; Romkens, P.F.A.M.; Comans, R.N.J.; Luster, J.; Pampura, T.; Shotbolt, L.; Tipping, Edward; De Vries, W.. (2010) Transfer functions for solid solution partitioning of cadmium, copper, nickel, lead and zinc in soils: derivation of relations for free metal ion activities and validation with independent data. *European Journal of Soil Science* 61 (1). 58-73..

Guo, P., Bai, G., Carver, B., Li, R., Bernardo, A., & Baum, M. (2007). Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. *Molecular Genetics and Genomics* 277, 1–12.

Hall, J. (2002). Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53 (366), 1-10.

Herbette, S., Taconnat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M.-L., Cuine, S., Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N. (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie* 88, 1751-1765.

Hodson, M. J. (2012). Metal toxicity and tolerance in plants. *Biochemist* 34, 28-32

Horbowicz, M., Kowalczyk, W., Grzesiuk, A., & Mitrus, J. (2011). Uptake of aluminium and basic elements, and accumulation of anthocyanins in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum*

*esculentum Moench*) as a result increased level of aluminium in nutrient solution. *Ecological Chemistry and Engineerings* 18 (4), 481-484.

Hossain, Pukclai Piyatida, Jaime A. Teixeira da Silva, and Masayuki Fujita, (2012). "Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation," *Journal of Botany*, vol. 2012

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (1 de Junio de 2016). *Estadísticas del medio ambiente*. Obtenido de INEGI: <http://www3.inegi.org.mx>

Jan, S., & Parray, J. A. (2016). Use of Mycorrhiza as Metal Tolerance Strategy in Plants. In Jan, & J. A. Parray, *Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plant* (pp. 57 - 65). Singapore: Springer - Science.

Keunen, E., Schellingen, K., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2016). Ethylene and Metal Stress: Small Molecule, Big Impact. *Plant Science* 7, artículo-23. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00023>

Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., y otros. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal* 50(2),347-63.

Klie, S., & Nikoloski, Z. (2012). The Choice between MapMan and Gene Ontology for Automated Gene Function Prediction in Plant Science. *Frontiers in Genetics* 3, 115.

Kopittke. (2016). Role of phytohormones in aluminum rhizotoxicity. *Plant Cell and Enviroment* 39, 2319-2328.

Kretzschmar, T., Burla, B., Lee, Y., Martinoia, E., & Nagy, R. (2011). Functions of ABC transporters in plants. *Essays in Biochemistry* 50, 145-160.

Lal N. (2010) Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants. In: Ashraf M., Ozturk M., Ahmad M. (eds) Plant Adaptation and Phytoremediation. Springer, Dordrecht

Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D. (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO Journal* 24, 4041–4051.

Lanquar, V., Ramos, M., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., & Krieger-Liszkay, A. K. (2010). Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiology* 152, 1986–1999 .

Le, M. J., Schikora, A., Mari, S., Briat, J.-F., Curie, C. 2005. A loss-of-function mutation in *AtYSL1* reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *The Plant Journal* 44, 769-782.

Liphadzi, M., & Kirkham, M. (2006). Physiological Effects of Heavy Metals on Plant Growth and Function. En: B. Huang (Ed.). *Plant-Environment Interactions* (págs. 247-252). Taylor and Francis.

Lubkowitz, M., Barnes, D., Breslav, M., Burchfield, A., Naider, F., & J.M., Becker. (1998). Schizosaccharomyces pombe isp4 encodes a transporter representing a novel family of oligopeptide transporters. *Molecular Microbiology* 28, 729-741.

Manara, A. (2012). Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. En: A. Furini (Ed). *Plants and Heavy Metals* (págs. 27-31). Springer Briefs In Molecular Science Biometals. Verona, Italia.

Martínez-Rendón, A. Y. (2013). *Efecto del Aluminio en el crecimiento relativo, tasa fotosintética y asociación con cristales de oxalato durante el ciclo de vida de Fagopyrum esculentum (Polygonaceae)*.

Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

México, Diario Oficial de la Federación de. (2 de Octubre de 2009). *PROGRAMA NACIONAL PARA LA PREVENCIÓN Y GESTIÓN INTEGRAL DE LOS RESIDUOS*. Obtenido de: <http://dof.gob.mx/>: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5112600&fecha=02/10/2009](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5112600&fecha=02/10/2009)

Merlos, R. M. A., Anjum, N. A., Heger, Z., Zitka, O., Vojtech, A., Pereira E., & Kizek, R. (2016). Role of Phytochelatins in Redox Caused Stress in Plants and Animals. En: Arun K. Shanker and Chitra Shanker (Eds). *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. INTECH

Mohammed, A. S., Kapri, A., & Goel, R. (2011). Heavy Metal Pollution: Source, Impact,. En: S. K. Mohammad, Z. Almas, & M. Javed (Eds), *Bio management of Metal-Contaminated Soils* (págs. 2-8). Springer. New York.

Myers, R. L., & Meinke, L. J. (1994). *Buckwheat: A Multi-Purpose, Short-Season Alternative: University of Missouri MU EXTENSION*. <http://hdl.handle.net/10355/8172>

Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., y otros. (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 55, 327-342.

Navarro-Aviñó, J., Aguilar Alonso, I., & López-Moya, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16 (2), 1-17.

Niyogi, K., & Fink, G. (1992). Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway. *Plant Cell* 4, 721–733.

O'Brien, J. A., & Benková, E. (2013). Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Sciences* 4, 451.

Pasternak, T., Rudas, V., Potters, G., & Jansen, M. A. (2005). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 53, 299-314.

Paulose, B., Jaiwal, P. K., & Dhanker, O. P. (2008). Heavy metal transporters in plants. En: P. Jaiwal, R. Singh & O. Dhanker (Eds), *Plant Membrane and Vacuolar Transporters* (págs. 218-230). CABI, Wallingford/Cambridge, 213-238

Pei, S., Qiu-Ying, T., Jie, C., & Wen-Hao, Z. (2009). Aluminium-induced inhibition of root elongation in Arabidopsis is mediated by ethylene and auxin. *Journal Experimental Botany* 61, 347-356.

Pellet, D. M., Grunes, D. L., & Kochian, L. V. (1995). Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays*). *Planta* 196 (4), 788-795.

Radwanski, E., & Last, R. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7, 921–934.

Ratan, P., & Preeti, K. (2011). *Fagopyrum esculentum* Moench (common buckwheat) edible plant of Himalayas: Review. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science* 1 (4), 426-430.

Raya-González, J., Pelagio-Flores, R., & López-Bucio, J. (2012). The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 169, 1348-1358.

Raymond, A., Wuana, & Okieimen, F. E. (2014). *Heavy Metal Contamination of Water and Soil*. Oakville, Canada: Apple Academic Press.

Reichman, S. (2002). The Responses of Plant to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. En: S. Reichman (Ed.), (págs. 7-54). Melbourne, Australia: Australian Minerals & Energy Environment Foundation.

Reyna-Llorens, I., Corrales, I., Poschenrieder, C., Barcelo, J., & Cruz-Ortega, R. (2015). Both aluminum and ABA induce the expression of an ABC-like transporter gene (*FeALS3*) in the Al-tolerant species *Fagopyrum esculentum*. *Environmental and Experimental Botany* 111, 74-82

Ruiz-Sola, M. A., Arbona, V., Gómez-Cadena, A., Rodríguez-Concepción, M., Rodríguez-Villalón, A. (2014). A Root Specific Induction of Carotenoid Biosynthesis Contributes to ABA Production upon Salt Stress in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* 9 (3), e90765.

Ryan, P., Tyerman, S., Sasaki, T., Furuichi, T., Yamamoto, Y., Zhang, W., y otros. (2010). The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany* 62 (1), 9-20.

Ryoichi, A., Murata, J., & Murata, Y. (2011). A Novel Barley Yellow Stripe 1-Like Transporter (HvYSL2) Localized to the Root Endodermis Transports Metal-Phytosiderophore Complexes. *Plant Cell Physiology* 52, 1932-1940.

Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 37, 501-506.

Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Ni, F.-T., Guo, D.-G., Li, H., & Li, W.-X. (2010). Perspective on Phytoremediation for Improving Heavy Metal-Contaminated Soils. En A. e. al., *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pág. 230). Qingdao: Springer .

Shen, R., Ma, J., Kyo, M., & Iwashita, T. (2002). Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta* 15, 394-398.

Smet, S. D., Cuypers, A., Vangronsveld, J., & Remans, T. (2015). Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in *Arabidopsis thaliana*: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 19195-19224.

Sun, P., Qiu-Ying, T., & Jie Chen and Wen-Hao, Z. (2010). Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal Experimental Botany* 61, 347–356.

Tani, F., & Barrington, S. (2005). Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Environmental Pollution* 138, 548-558.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* 101, 133-135.

Thomas, C. L., Bayer, E. M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., & Maule, A. J. (2008). Specific Targeting of a Plasmodesmal Protein Affecting Cell-to-Cell Communication. *Plos Biology* 6 (1) e7.

Tuteja, N. (2009). Integrated Calcium Signaling in Plants. En: F. Baluška, & S. Mancuso (Eds), *Signaling in Plants, Signaling and Communication in Plants* (págs. 20-46). Berlin Heidelberg: Springer.

Upadhyaya, H., Panda, S. K., Bhattacharjee, M. K., & Dutta, S. (2010). Role of arbuscular mycorrhiza in heavy metal tolerance in plants: prospects for phytoremediation . *Journal of Phytology* 2/7 , 16-27

Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies* 55, 53.

Vries, W. D., Groenenberg, J. E., Lofts, S., Tipping, E., & Posch, M. (2013). Critical Loads of Heavy Metals for Soils. En: B. J. Alloway (Ed), *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils* (pág. 211). Dordrecht: Springer Science.

Wang, J., Evangelou, B., & Nielsen, M. (1992). Surface chemical properties of purified root cell walls from two tobacco genotypes exhibiting different tolerance to manganese toxicity. *Plant Physiology* 100, 496-501.

Wang, J. W., Li, Y., Zhang, Y. X., Chai, T. Y. (2013). Molecular cloning and characterization of a Brassica juncea yellow stripe-like gene, BjYSL7, whose overexpression increases heavy metal tolerance of tobacco. *Plant Cell Reports* 32(5), 651-62

Waters, B. M., Chu, H.-H., DiDonato, R. J., Roberts, L. A., Easley, B. L., Salt, D. E., Walker, E. (2006). Mutations in Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe Like 3 Reveal their roles in Metal Ion Homeostasis and Loading of Metal Ions in Seeds. *Plant Physiology* 141, 1446-1458.

Yokosho, K., Yamaji, N., & Ma, J. (2014). Global transcriptome analysis of Al-induced genes in an Al-accumulating species, common buckwheat. *Plant Cell Physiol* 55, 2077–2091.

Yoshimura, E., Kohdr, H., Mori, S., & Hider, R. (2011). The binding of aluminum to mugineic acid and related compounds as studied by potentiometric titration. *Biometals* 24, 723-7.

Zhao, C.-R., Ikka, T., Sawaki, Y., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Hibino, T., y otros. (2008). Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* , 1-4.

Zheng, S. J., Ma, J. F., & Matsumoto, H. (1998). High Aluminum Resistance in Buckwheat. *Plant Physiology* 117, 745-751.

## 8. Anexos

**Tabla 1A. Lista de los 264 genes inducidos en común al tratamiento con los metales Al, Cu o Zn a las 24 h en *F. esculentum*.**

iD	Nombre del gen
At1g01680	plant U-box 54(PUB54)
At1g02350	protoporphyrinogen oxidase-like protein(AT1G02350)
At1g03370	C2 calcium/lipid-binding and GRAM domain containing protein(AT1G03370)
At1g04530	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein(TPR4)
At1g04560	AWPM-19-like family protein(AT1G04560)
At1g05370	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein(AT1G05370)
At1g05380	Acyl-CoA N-acyltransferase with RING/FYVE/PHD-type zinc finger protein(AT1G05380)
At1g07820	Histone superfamily protein(AT1G07820)
At1g07830	ribosomal protein L29 family protein(AT1G07830)
At1g08580	hypothetical protein(AT1G08580)
At1g09935	Phosphoglycerate mutase family protein(AT1G09935)
At1g12210	RPS5-like 1(RFL1)
At1g12540	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein(AT1G12540)
At1g15180	MATE efflux family protein(AT1G15180)
At1g15210	pleiotropic drug resistance 7(ABCG35)
At1g16610	arginine/serine-rich 45(SR45)
At1g18100	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein(E12A11)
At1g20780	senescence-associated E3 ubiquitin ligase 1(SAUL1)
At1g22160	senescence-associated family protein (DUF581)(AT1G22160)
At1g22630	SSUH2-like protein(AT1G22630)
At1g22920	COP9 signalosome 5A(CSN5A)
At1g22940	thiamin biosynthesis protein(TH1)
At1g23300	MATE efflux family protein(AT1G23300)
At1g24996	hypothetical protein(AT1G24996)
At1g27350	Ribosome associated membrane protein RAMP4(AT1G27350)
At1g29930	chlorophyll A/B binding protein 1(CAB1)
At1g30400	multidrug resistance-associated protein 1(ABCC1)
At1g31070	N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase 1(GlcNAc1pUT1)
At1g31260	zinc transporter 10 precursor(ZIP10)
At1g31290	ARGONAUTE 3(AGO3)
At1g32360	Zinc finger (CCCH-type) family protein(AT1G32360)
At1g34050	Ankyrin repeat family protein(AT1G34050)
At1g34710	hypothetical protein(AT1G34710)
At1g37045	hypothetical protein(AT1G37045)
At1g47495	hypothetical protein(AT1G47495)
At1g49015	DPP6 N-terminal domain-like protein(AT1G49015)
At1g49710	fucosyltransferase 12(FUT12)

At1g50390	pfkB-like carbohydrate kinase family protein(AT1G50390)
At1g52940	purple acid phosphatase 5(PAP5)
At1g55370	NDH-dependent cyclic electron flow 5(NDF5)
At1g55840	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein(AT1G55840)
At1g58280	Phosphoglycerate mutase family protein(AT1G58280)
At1g60095	Mannose-binding lectin superfamily protein(AT1G60095)
At1g60880	AGAMOUS-like-56(AGL56)
At1g64170	cation/H+ exchanger 16(CHX16)
At1g65660	Pre-mRNA splicing Prp18-interacting factor(SMP1)
At1g65990	type 2 peroxiredoxin-related / thiol specific antioxidant / mal allergen family protein(AT1G65990)
At1g67860	transmembrane protein(AT1G67860)
At1g68590	Ribosomal protein PSRP-3/Ycf65(PSRP3/1)
At1g70720	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein(AT1G70720)
At1g73340	Cytochrome P450 superfamily protein(AT1G73340)
At1g75590	SAUR-like auxin-responsive protein family(AT1G75590)
At1g75700	HVA22-like protein G(HVA22G)
At1g75710	C2H2-like zinc finger protein(AT1G75710)
At1g77090	thylakoid luminal protein (Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein)(AT1G77090)
At1g79200	splicing regulatory glutamine/lysine-rich-like protein(SCI1)
At1g79740	hAT transposon superfamily(AT1G79740)
At1g80110	phloem protein 2-B11(PP2-B11)
At2g01920	ENTH/VHS/GAT family protein(AT2G01920)
At2g02440	transmembrane protein(AT2G02440)
At2g03000	RING/U-box superfamily protein(AT2G03000)
At2g03460	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein(AT2G03460)
At2g03500	Homeodomain-like superfamily protein(AT2G03500)
At2g03510	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family(AT2G03510)
At2g05642	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein(AT2G05642)
At2g06908	hypothetical protein(AT2G06908)
At2g10020	hypothetical protein(AT2G10020)
At2g14110	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein(AT2G14110)
At2g14130	hypothetical protein(AT2G14130)
At2g14450	hypothetical protein(AT2G14450)
At2g14530	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 13(TBL13)
At2g14700	hypothetical protein(AT2G14700)
At2g15460	Pectin lyase-like superfamily protein(AT2G15460)
At2g15590	spire, putative (DUF1685)(AT2G15590)
At2g16160	hypothetical protein(AT2G16160)
At2g16200	structural molecule(AT2G16200)
At2g16460	coiled-coil 90B-like protein (DUF1640)(AT2G16460)
At2g17040	NAC domain containing protein 36(NAC036)
At2g17290	Calcium-dependent protein kinase family protein(CPK6)
At2g17870	cold shock domain protein 3(CSP3)
At2g18240	Rer1 family protein(AT2G18240)

At2g18290	anaphase promoting complex 10(APC10)
At2g19560	proteasome family protein(EER5)
At2g19750	Ribosomal protein S30 family protein(AT2G19750)
At2g20070	defensin-like protein(AT2G20070)
At2g20240	GPI-anchored adhesin-like protein, putative (DUF3741)(TRM17)
At2g21150	XAP5 family protein(XCT)
At2g21210	SAUR-like auxin-responsive protein family(AT2G21210)
At2g21240	basic pentacysteine 4(BPC4)
At2g21340	MATE efflux family protein(AT2G21340)
At2g21900	WRKY DNA-binding protein 59(WRKY59)
At2g22560	Kinase interacting (KIP1-like) family protein(NET2D)
At2g22920	serine carboxypeptidase-like 12(SCPL12)
At2g23950	Leucine-rich repeat protein kinase family protein(AT2G23950)
At2g24270	aldehyde dehydrogenase 11A3(ALDH11A3)
At2g26700	AGC (cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C) kinase family protein(PID2)
At2g27505	FBD-like domain family protein(AT2G27505)
At2g27730	copper ion binding protein(AT2G27730)
At2g29995	PSY3-like protein(AT2G29995)
At2g31955	cofactor of nitrate reductase and xanthine dehydrogenase 2(CNX2)
At2g32710	Cyclin-dependent kinase inhibitor family protein(AT2G32710)
At2g33990	IQ-domain 9(iqd9)
At2g34200	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein(AT2G34200)
At2g36380	pleiotropic drug resistance 6(ABCG34)
At2g36750	UDP-glucosyl transferase 73C1(UGT73C1)
At2g37110	PLAC8 family protein(AT2G37110)
At2g37160	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein(AT2G37160)
At2g39950	flocculation protein(AT2G39950)
At2g40080	EARLY FLOWERING-like protein (DUF1313)(ELF4)
At2g40110	Yippee family putative zinc-binding protein(AT2G40110)
At2g40650	PRP38 family protein(AT2G40650)
At2g41090	Calcium-binding EF-hand family protein(AT2G41090)
At2g43460	Ribosomal L38e protein family(AT2G43460)
At2g43810	Small nuclear ribonucleoprotein family protein(LSM6B)
At2g44310	Calcium-binding EF-hand family protein(AT2G44310)
At2g45410	LOB domain-containing protein 19(LBD19)
At3g03310	lecithin:cholesterol acyltransferase 3(LCAT3)
At3g04980	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein(AT3G04980)
At3g06080	trichome birefringence-like protein (DUF828)(TBL10)
At3g06200	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein(AT3G06200)
At3g06250	FAR1-related sequence 7(FRS7)
At3g06690	putative acyl-coenzyme A oxidase(AT3G06690)
At3g07100	Sec23/Sec24 protein transport family protein(ERMO2)
At3g08700	ubiquitin-conjugating enzyme 12(UBC12)
At3g12750	zinc transporter 1 precursor(ZIP1)
At3g14450	CTC-interacting domain 9(CID9)
At3g19560	F-box family protein(AT3G19560)

At3g19740	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein(AT3G19740)
At3g21130	F-box and associated interaction domains-containing protein(AT3G21130)
At3g21480	BRCT domain-containing DNA repair protein(AT3G21480)
At3g21870	cyclin p2;1(CYCP2;1)
At3g25950	TRAM, LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein(AT3G25950)
At3g26160	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 17(CYP71B17)
At3g26750	HECT-like ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-binding protein(AT3G26750)
At3g28550	Proline-rich extensin-like family protein(AT3G28550)
At3g43660	Vacuolar iron transporter (VIT) family protein(AT3G43660)
At3g44110	DNAJ homologue 3(J3)
At3g44820	Phototropic-responsive NPH3 family protein(AT3G44820)
At3g45400	exostosin family protein(AT3G45400)
At3g46650	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein(AT3G46650)
At3g49440	F-box associated ubiquitination effector family protein(AT3G49440)
At3g51250	Senescence/dehydration-associated protein-like protein(AT3G51250)
At3g52870	IQ calmodulin-binding motif family protein(AT3G52870)
At3g53540	afadin(TRM19)
At3g57960	Emsy N Terminus (ENT) domain-containing protein(AT3G57960)
At3g60960	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein(AT3G60960)
At3g61200	Thioesterase superfamily protein(AT3G61200)
At3g62010	metal ion-binding protein(AT3G62010)
At4g00140	Calcium-binding EF-hand family protein(EDA34)
At4g00620	Amino acid dehydrogenase family protein(EMB3127)
At4g01780	XH/XS domain-containing protein(AT4G01780)
At4g01880	methyltransferase(AT4G01880)
At4g02180	DC1 domain-containing protein(AT4G02180)
At4g06744	Leucine-rich repeat (LRR) family protein(AT4G06744)
At4g07390	Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein(AT4G07390)
At4g08810	calcium ion binding protein(SUB1)
At4g08870	Arginase/deacetylase superfamily protein(ARGAH2)
At4g08900	arginase(ARGAH1)
At4g09280	hypothetical protein(AT4G09280)
At4g09640	magnesium transporter, putative (DUF803)(AT4G09640)
At4g09770	TRAF-like family protein(AT4G09770)
At4g09840	hypothetical protein(AT4G09840)
At4g09890	mediator of RNA polymerase II transcription subunit, putative (DUF3511)(AT4G09890)
At4g09970	transmembrane protein(AT4G09970)
At4g10265	Wound-responsive family protein(AT4G10265)
At4g10610	CTC-interacting domain 12(CID12)
At4g10695	CDC68-like protein(AT4G10695)
At4g10840	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein(KLCR1)
At4g10880	hypothetical protein(AT4G10880)
At4g10890	DDE family endonuclease(AT4G10890)
At4g11560	bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein(AT4G11560)
At4g12930	hypothetical protein(AT4G12930)
At4g13550	putative triglyceride lipase(AT4G13550)

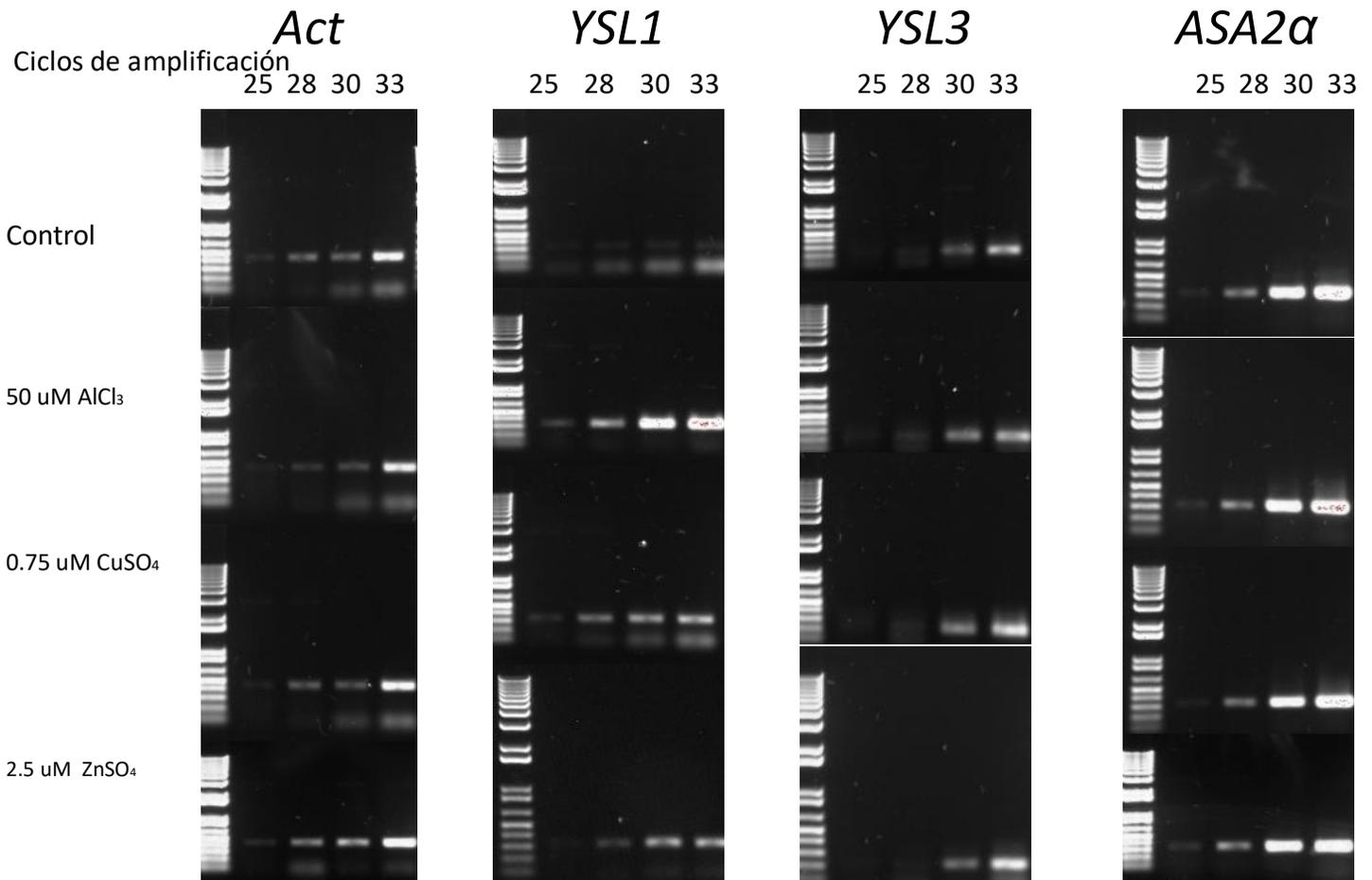
At4g14480	Protein kinase superfamily protein(AT4G14480)
At4g14830	17.6 kDa class II heat shock protein(HSP1)
At4g14965	membrane-associated progesterone binding protein 4(MAPR4)
At4g15550	indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase(IAGLU)
At4g16500	Cystatin/monellin superfamily protein(AT4G16500)
At4g16515	root meristem growth factor(RGF6)
At4g17080	Histone H3 K4-specific methyltransferase SET7/9 family protein(AT4G17080)
At4g17140	pleckstrin homology (PH) domain-containing protein(AT4G17140)
At4g17210	weak chloroplast movement under blue light protein (DUF827)(AT4G17210)
At4g17940	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein(AT4G17940)
At4g18830	ovate family protein 5(OFP5)
At4g19730	Glycosyl hydrolase superfamily protein(AT4G19730)
At4g22235	defensin-like protein(AT4G22235)
At4g22630	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein(AT4G22630)
At4g22740	glycine-rich protein(AT4G22740)
At4g23000	Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily protein(AT4G23000)
At4g24120	YELLOW STRIPE like 1(YSL1)
At4g24590	RING finger protein(AT4G24590)
At4g24880	snurportin-1 protein(AT4G24880)
At4g26190	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein(AT4G26190)
At4g28420	Tyrosine transaminase family protein(AT4G28420)
At4g30740	QWRF motif protein(AT4G30740)
At4g32080	hypothetical protein(AT4G32080)
At4g32850	nuclear poly(a) polymerase(nPAP)
At4g32860	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein(AT4G32860)
At4g32970	BRISC/BRCA1-A complex protein(AT4G32970)
At4g34040	RING/U-box superfamily protein(MBR2)
At5g01730	SCAR family protein 4(SCAR4)
At5g01840	ovate family protein 1(OFP1)
At5g02502	Oligosaccharyltransferase(AT5G02502)
At5g04020	calmodulin binding protein(AT5G04020)
At5g05730	anthranilate synthase alpha subunit 1(ASA1)
At5g06265	hyaluronan mediated motility receptor-like protein(AT5G06265)
At5g06280	hypothetical protein(AT5G06280)
At5g07480	KAR-UP oxidoreductase 1(KUOX1)
At5g07660	structural maintenance of chromosomes 6A(SMC6A)
At5g10810	enhancer of rudimentary protein(ER)
At5g11470	bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein(AT5G11470)
At5g14610	DEAD box RNA helicase family protein(AT5G14610)
At5g14620	domains rearranged methyltransferase 2(DRM2)
At5g15060	Lateral organ boundaries (LOB) domain family protein(AT5G15060)
At5g16400	thioredoxin F2(TRXF2)
At5g17200	Pectin lyase-like superfamily protein(AT5G17200)
At5g17410	Spc97 / Spc98 family of spindle pole body (SBP) component(AT5G17410)
At5g17500	Glycosyl hydrolase superfamily protein(AT5G17500)
At5g18170	glutamate dehydrogenase 1(GDH1)
At5g20440	Mob1/phocein family protein(AT5G20440)

At5g22680	F-box protein(AT5G22680)
At5g23600	RNA 2'-phosphotransferase, Tpt1 / KptA family(AT5G23600)
At5g25030	ATP-binding protein (DUF2431)(AT5G25030)
At5g25170	PPPDE putative thiol peptidase family protein(AT5G25170)
At5g25240	stress induced protein(AT5G25240)
At5g25415	hypothetical protein (DUF239)(AT5G25415)
At5g28220	Protein prenyltransferase superfamily protein(AT5G28220)
At5g32590	myosin heavy chain-like protein(AT5G32590)
At5g34860	hypothetical protein(AT5G34860)
At5g35737	Ta11-like non-LTR retrotransposon(AT5G35737)
At5g36170	high chlorophyll fluorescent 109(HCF109)
At5g39170	myb-like protein Q(AT5G39170)
At5g39680	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein(EMB2744)
At5g39720	avirulence induced protein 2 like protein(AIG2L)
At5g39800	Mitochondrial ribosomal protein L27(AT5G39800)
At5g40660	ATP12 protein-like protein(AT5G40660)
At5g41790	COP1-interactive protein 1(CIP1)
At5g42040	regulatory particle non-ATPase 12B(RPN12b)
At5g42330	hypothetical protein(AT5G42330)
At5g43120	ARM-repeat/Tetratricopeptide repeat (TPR)-like protein(AT5G43120)
At5g43520	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein(AT5G43520)
At5g43840	heat shock transcription factor A6A(HSFA6A)
At5g44070	phytochelatin synthase 1 (PCS1)(CAD1)
At5g44850	Protein with RNI-like/FBD-like domain(AT5G44850)
At5g45670	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein(AT5G45670)
At5g47220	ethylene responsive element binding factor 2(ERF2)
At5g48590	phosphoserine aminotransferase, putative (DUF760)(AT5G48590)
At5g49030	tRNA synthetase class I (I, L, M and V) family protein(OVA2)
At5g49450	basic leucine-zipper 1(bZIP1)
At5g49890	chloride channel C(CLC-C)
At5g50335	hypothetical protein(AT5G50335)
At5g52280	Myosin heavy chain-related protein(AT5G52280)
At5g52890	AT hook motif-containing protein(AT5G52890)
At5g53010	calcium-transporting ATPase(AT5G53010)
At5g53590	SAUR-like auxin-responsive protein family(AT5G53590)
At5g57690	diacylglycerol kinase 4(DGK4)
At5g58500	LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS-like protein (DUF640)(LSH5)
At5g59370	actin 4(ACT4)
At5g66070	RING/U-box superfamily protein(AT5G66070)
At5g66450	Phosphatidic acid phosphatase (PAP2) family protein(LPPepsilon2)
At5g67030	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)(ABA1)
At5g67600	cysteine-rich TM module stress tolerance protein(WIH1)
At2g16480	
AT5G27807.1	

**Tabla 2A. Lista de los 51 genes inducidos en común al tratamiento con los metales Al, Cu o Zn a las 48 h en *F. esculentum*.**

Id	Nombre del gen
At1g07320	ribosomal protein L4(RPL4)
At1g07980	nuclear factor Y, subunit C10(NF-YC10)
At1g53060	Legume lectin family protein(AT1G53060)
At1g59990	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein(EMB3108)
At1g62220	transmembrane protein(AT1G62220)
At1g68460	isopentenyltransferase 1(IPT1)
At1g68920	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein(AT1G68920)
At1g71490	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein(AT1G71490)
At1g74360	Leucine-rich repeat protein kinase family protein(AT1G74360)
At1g76420	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein(CUC3)
At1g76590	PLATZ transcription factor family protein(AT1G76590)
At1g76780	HSP20-like chaperones superfamily protein(AT1G76780)
At1g77885	hypothetical protein(AT1G77885)
At2g01660	plasmodesmata-located protein 6(PDLP6)
At2g20920	chaperone (DUF3353)(AT2G20920)
At2g22900	Galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein(AT2G22900)
At3g13490	Lysyl-tRNA synthetase, class II(OVA5)
At3g19280	fucosyltransferase 11(FUT11)
At3g28600	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein(AT3G28600)
At3g32070	hypothetical protein(AT3G32070)
At3g53350	ROP interactive partner 4(RIP3)
At4g10020	hydroxysteroid dehydrogenase 5(HSD5)
At4g21000	alpha carbonic anhydrase 6(ACA6)
At4g21920	hypothetical protein(AT4G21920)
At4g28770	Tetraspanin family protein(AT4G28770)
At4g35400	hypothetical protein(AT4G35400)
At4g36470	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein(AT4G36470)
At4g37860	SPT2 chromatin protein(AT4G37860)
At5g14610	DEAD box RNA helicase family protein(AT5G14610)
At5g17890	DA1-related protein 4(DAR4)
At5g25870	hypothetical protein(AT5G25870)
At5g26805	B3 domain protein(AT5G26805)
At5g31787	hypothetical protein(AT5G31787)

At5g37370	PRP38 family protein(ATSRL1)
At5g39170	myb-like protein Q(AT5G39170)
At5g40760	glucose-6-phosphate dehydrogenase 6(G6PD6)
At5g42325	Transcription factor IIS protein(AT5G42325)
At5g42540	exoribonuclease 2(XRN2)
At5g44570	transmembrane protein(AT5G44570)
At5g48290	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein(AT5G48290)
At5g50050	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein(AT5G50050)
At5g51650	hypothetical protein(AT5G51650)
At5g52000	importin alpha isoform 8(IMPA-8)
At5g52310	low-temperature-responsive protein 78 (LTI78) / desiccation-responsive protein 29A (RD29A)(LTI78)
At5g52490	Fibrillarin family protein(AT5G52490)
At5g52890	AT hook motif-containing protein(AT5G52890)
At5g62710	Leucine-rich repeat protein kinase family protein(AT5G62710)
At5g63060	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein(AT5G63060)
At5g65010	asparagine synthetase 2(ASN2)
At5g67330	natural resistance associated macrophage protein 4(NRAMP4)
AT5G58320.2	



**Figura 1 A. Curvas de expresión exponencial.** Determinación de los ciclos de amplificación adecuados para la visualización de los cambios en la expresión de los genes *Act*, *FeYSL1*, *FeYSL3* y *FeASA2α* en las distintas condiciones.

5'GTCGGAGTTGACTGTGGGCAATGGTCCAAATAGCTACAAGAATCTCAAACCTGGCTGGATGACTGGATTTCTGTTTGTAGCAGCTTTGTTGGTTTGTGGGCATTGGTTCCACTTAGAAAGATCATGATAATAGATTATAAACTCGCTTATCCAAGTGGAAGTGCAGTTCTCATCAATGGGTTTACACGGCGAAAGGAGACAAGAATGCCAATCAAGTTAATGGATTTGTGAAAATTTCTCCTTGAGCTTCTGTGGAGCTTCTCCAGTGGTTCTATTCCGGAGGAAATACTTGTGGCTTTGGCCAATCCCTACTTTTGGATTGCAGGCTTGGAAAACTCTTTTACTTCGATTTTACCATGAGCTATGTTGGAGCTGGAATGATATGTTCTCATCTTGTGAAGTGGTCACTTCTCCTTGGCGCAACTCTTCTGGGGTGATGTGGCCATTATTCATGGGTTCAAAGGAAAGTGGTTTCTGCATCAATACCCGAGAGCAGTATGAAAAGTCTCAATGGTTATAAGGTATTTATTTCAATTGCCCTCATACTTGGAGATGGGCTTTATAATTTTCTTAAGGTGCTGTATTACACCATGAGAAACATCTATGCCAGATTGAAGGAAAAGAATACTAGAACCTTTTCGGAGAGCCAACTCAACGGTTAGATGATCTTCAACGGAACGAGATCTTTGTAAGAGAACTATTCCTGTTTGGCTAGCCTGCATTGGATATGGAGTCTTGGCAATGGTTTCCATCATTGTTATCCCCCTTATGTTCCCTGAGCTGAAGTGGTACTATGTTGTAATTGCCTACATTCTTGCACCTTCTCTGAGCTTCTGCAATGCATATGGTGTGGTTTACTGACATGAACATGGCCTATAACTACGG3'

**Figura 2A. Secuencia parcial del gen *FeYSL3* (911 pb),** obtenida del ensamble de fragmentos de 100 pb provenientes del archivo DRX007657.

5'CATGGACCGAGCAGATCACGTTAAGAGGAGTTGTTGTGAGTGTGATTTTGGGTGTGATTTATAGCATTATAGCTATGAGGTTGAATCTCACTACTGGTCTTAGTCTGAATCTAACGTTTCTGCTGGTCTTCTTGCCTTTGTGCTCATTCGTTGTTGGACTAAGATACAAGAGAAAGTTGGGATTTCAACTGTTCCATTCACTAAACAAGAGAATACTATGATTCAGACTTCTGCTGTTGCTTATAGCATTGCACCTGGAGGTGGGTTTGGATCCTATTTGTTAGGACTCAACAAGAAGACATATGAGTTAGCTGGTGTAGACACTCAAGGAACTCGCCGGGTAGCTATAAGGAACCGGCTGTTGGTTGGATGACTTCTTATCTATTCTTGGTTTCTTTGTTGGGTTGTTTGTGTTGATTCTCTCAGGAAGATCTTGATAGTAGACTATAAATTGACATACCCAAGTGAATGGCTACTGCAGTTCTTATAAATGGATTTCACTCGCAGGGAGACAAAGTATCAAAGGAGCAAGTGAAGCGGTTTGCTAAGTT3'

**Figura 3A. Secuencia parcial del gen *FeYSL1* (559 pb),** obtenida del ensamble de fragmentos de 100 pb provenientes del archivo DRX007657.

5'CTGAAGCGTTTTGTGGTGGATGGGTTGGATATTTCTCATATGATACTGTTCGCTATGTGGAGAAGAAAAAGCTT  
CCTTTTTCTAATGCTCCCATGGATGACAGGAACCTTCCGGACCTCCACTTAGGGTTATACGATAATATTATCGTTTT  
CGATCATGTGGAGAAGAAAGTGTACGTGATCCAGTGGGTTCAATTAGATCAATATTCATCTGTTGAGGAGGCAT  
ACAAGGATGGAATGGAAAGGTTGGATTCTTTGGTGTCTAGAGTTCATGGAAGAGACATGCCAAAGCTTGCCGCT  
GGTTCAATCAAACCTGAAGACTAGTCTTTTTGGTCCATCCTTGGAGAATTGGAACATGACAAAAGAGGAATATCAG  
AAAGCTGTGTTGCGATCAAAAACATATACTTGCAGGAGACATATTTTCAGATCGTGCTGAGTCAACGTTTTGAGCG  
GCGAACATTTGCAGAAGAACATATCCTGGCTGGTGACATATTCCAGATCGTGTTAAGTCAGCGTTTTGAAAGGCG  
AACATTTGCAGACCCTTTGAAATATACAGAGCTTTGAGAATTGTTAATCCAAGTCCGTATATGACATACCTTCAG  
GCTAGGGGATGTATTCTAGTTGGATCAAGTCTGAAATCCTCACCCGTGTGAAGAAGGGCAAAGTCACCAATAG  
ACCCTTGGCTGGAACCTATCCGAAGAGGAAAGACTCCTAAAGAAGATCTCATGTTGGAAGAGCAGCTTTTGAACG  
ATGAAAAGCAAAGAGCAGAGCATATTATGCTCGTCGACCTAGGAAGGAATGACGTTGGAAGGTCTCAAAACC  
AGGTTCTGTGAAAGTTGAAAAGCTGATGAACATCGCGAGCTGCATTGCCTGTTGGAAGTGTAGCGGAGCTCC3'

**Figura 4A. Secuencia parcial del gen *FeASA1* (894 pb),** obtenida del ensamble de fragmentos de 100 pb provenientes del archivo DRX007657.

5'CTGGGGAAAAGGACGTGTCACTTTGTTAGGTGATTCTGTCCATGCTATGCAGCCAAACATGGGTCAAGGGGGT  
TGCATGGCAATCGAGGATGGCTACCAACTTGCTTTGGAGCTCGATAAAGCTTGGGAAGATAGTGTGCAAATGG  
AAAGCCTATTGACATTGTTTCTTCTTAAGAGTTATGAGAAAGCTAGAAGACTCCGGGTGGCCGTGATTCACGG  
AATGGCAAGAATGGCAGCAATAATGGCATCAACTTACAAGGCATATTTAGGTGTTGGACTTGGTCCATTGTCGTT  
CCTGACAAATTTGAGGATACCACATCCAGGGAGAGTTGGTGGGAGATTTTTTCATTGATCAAGCGATGCCTCCAAT  
GCTTAGCTGGGTTTTGGGTGGTAACAGCTCAAACCTTGAAGGAAGGCCCCAGCGTGCAGACTCTCAGACAGAC  
AAGTGATCAACTAAAGACATGGTTTGAAGATGACTATGCCCTAGAGCGTGCTATAAATGGAGAGTGGTACCTTC  
TCCCACAGGGAACTCTACAGGTGTGGCACCTATTTGTTTGATCCGAGAAGAAGACAAAGTTTACCTTATTGGGA  
GCATAGCTAGTGAAGATTCTCCAGGATCATCCATCGTGCTGCCTTATCCTCAGGTTTCGGAAAAGCATGCCCGCA  
TTAGCGTAAAAAATGGTGCTTTTTTTCTTGACTGATCTACGAAGTGAGCACGGAACCTTCATCACCGATACCGAG 3'

**Figura 5A. Secuencia parcial del gen *FeZEP* (894 pb),** obtenida del ensamble de fragmentos de 100 pb provenientes del archivo DRX007657.

