

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias Ingeniería en Biosistemas

“Respuesta del gen *CchGLP* en tabaco transgénico bajo salinidad y toxicidad por metales pesados”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestría en Ciencias en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

Diana Sáenz de la O

Dirigido por:

M. en C. Germán Cárdenas Manríquez

M. en C. Germán Cárdenas Manríquez
Presidente


Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario


Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Vocal


Firma

Dr. Enrique Rico García
Suplente


Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Suplente


Firma

Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2017

RESUMEN

El desarrollo de cultivos tolerantes a altos niveles de sales metálicas representa una alternativa para asegurar la producción agrícola en suelos contaminados. El objetivo de este trabajo fue investigar la respuesta ante estrés abiótico, específicamente salinidad y toxicidad por metales pesados, de la planta transgénica de *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi nc que expresa el gen *Capsicum chinense Germin-Like Protein (CchGLP)*. Los tratamientos se aplicaron durante la etapa de germinación, bajo condiciones in vitro, y en etapa de plántula, bajo condiciones de invernadero. Las semillas de este modelo de dos líneas altamente expresivas, L8 y L26, así como una línea acigoto (que alberga el gen, pero no lo expresa), L1, fueron expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio, cloruro de aluminio y cloruro de sodio. Se evaluaron las respuestas fenotípicas para la etapa de germinación en términos de porcentaje de germinación y longitud de raíz. En etapa de plántula se evaluó el vigor midiendo altura de la planta, diámetro basal del tallo y contenido de clorofila en hoja. También se determinó la biomasa vegetativa y radical al finalizar el periodo experimental. Los efectos de los tratamientos de cadmio (Cd) y aluminio (Al) sobre el nivel de metilación del ADN en etapa de germinación se analizaron usando el kit 5-mC DNA ELISA. Durante la germinación y en estadios tempranos, la línea transgénica L8 fue la línea que fenotípicamente demostró tener mayor tolerancia al estrés por metales pesados. Nuestras observaciones con respecto a la metilación en etapa de germinación sugieren fuertemente que los cambios en el estado de metilación debido al estrés ambiental desencadenan la activación de genes implicados en la resistencia. Sin embargo, es necesaria una evidencia directa adicional para probar esta teoría. En etapa de plántula se hizo evidente bajo el tratamiento con CdCl₂ 500 µM que la inserción y expresión del gen les confirió a las plantas transgénicas mayor tolerancia durante la etapa de anthesis y floración. Así como mayor biomasa vegetativa y mayor vigor y biomasa radicular al finalizar el periodo experimental.

Palabras clave: *Nicotiana tabacum* c.v. Xanthi nc, tabaco transgénico, tolerancia a aluminio, tolerancia a cadmio, tolerancia a salinidad, metilación del ADN.

SUMMARY

The development of tolerant crops against high levels of metal salts represents an alternative to ensure agricultural production in contaminated soils. The objective of this work was to investigate the response to abiotic stress, specifically salinity and toxicity by heavy metals, of the transgenic plant of *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi nc that expresses the gene *Capsicum chinense Germin-Like Protein (CchGLP)*. The treatments were applied during the germination stage, under in vitro conditions, and in the seedling stage, under greenhouse conditions. The seeds of this model of two highly expressive lines, L8 and L26, as well as an azygote line (which harbors the gene, but does not express it), L1, were exposed to different concentrations of cadmium chloride, aluminum chloride and sodium chloride. The phenotypic responses for the germination stage were evaluated in terms of germination percentage and root length. In the seedling stage, the vigor was evaluated by measuring the height of the plant, the basal diameter of the stem and the leaf chlorophyll content. The vegetative and radical biomass were also determined at the end of the experimental period. The effects of cadmium (Cd) and aluminum (Al) treatments on the level of DNA methylation at the germination stage were analyzed using the 5-mC DNA ELISA kit. During germination and in early stages, the L8 transgenic line was the line that phenotypically proved to have greater tolerance to heavy metal stress. Our observations regarding methylation during germination strongly suggest that changes in methylation status due to environmental stress trigger the activation of genes involved in resistance. However, additional direct evidence is necessary to prove this theory. In the seedling stage, it became evident under the 500 μM CdCl₂ treatment that the insertion and expression of the gene gave the transgenic plants greater tolerance during the anthesis and flowering stage. As well as greater vegetative biomass and greater vigor and root biomass at the end of the experimental period.

Key words: *Nicotiana tabacum* c.v. Xanthi nc, transgenic tobacco, aluminium tolerance, cadmium tolerance, salinity tolerance, DNA-methylation.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradezco principalmente a mi familia por siempre apoyarme de forma incondicional en todo lo que realizo. A la Universidad Autónoma de Querétaro y a todos los profesores e investigadores que forman parte del grupo de biosistemas, porque desde un inicio encontré las puertas abiertas para formar parte de esta gran institución educativa. A mis asesores de tesis porque representan un ejemplo de excelencia en el campo de la investigación. A todos mis compañeros de laboratorio y de maestría en el Campus Amazcala porque cada uno de ellos me enseñó tanto y formábamos un gran equipo.

A CONACYT porque la ayuda económica fue clave para poder estudiar este posgrado.

Esta tesis la dedico a Alberto, Violeta, Adriana y Fausto.

CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	2
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	9
ESTRÉS POR METALES PESADOS.....	9
<i>Cadmio.....</i>	<i>11</i>
<i>Aluminio.....</i>	<i>12</i>
ESTRÉS POR SALINIDAD.....	14
METILACIÓN DEL ADN.....	15
PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	16
TABACO COMO MODELO TRANSGÉNICO	16
CCHGLP	17
TABACO TRANSGÉNICO AL GEN CCHGLP	19
3. MOTIVACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
MATERIALES.....	25
<i>Material vegetal y germinación</i>	<i>25</i>
MÉTODOS.....	25
<i>Determinación de la respuesta diferencial fenotípica en etapa de germinación y estadios tempranos.</i>	<i>25</i>
<i>Determinación de los patrones de metilación del ADN en etapa de germinación.</i>	<i>26</i>
<i>Determinación de la respuesta diferencial fenotípica en etapa de plántula.</i>	<i>27</i>
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA DIFERENCIAL FENOTÍPICA EN ETAPA DE GERMINACIÓN Y ESTADIOS TEMPRANOS.	29
DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE METILACIÓN DEL ADN EN ETAPA DE GERMINACIÓN.....	33
DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA DIFERENCIAL FENOTÍPICA EN ETAPA DE PLÁNTULA.....	34
RESUMEN DE RESULTADOS.....	39
8. CONCLUSIÓN.....	41
9. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de tratamientos de aplicación.....	27
Tabla 2. Porcentaje de metilación (%5-met) de la línea 1 y la línea 8 al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de Al y Cd.....	34
Tabla 3. Promedio del peso seco de la parte aérea de la línea 1 y la línea 8 bajo los diferentes tratamientos con sales metálicas.	37
Tabla 4. Promedio del peso seco de raíz de la línea 1 y la línea 8 bajo los diferentes tratamientos con sales metálicas.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología empleada para la obtención de las plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> (Ruíz-Nito, 2009)	20
Figura 2. Porcentaje de germinación de la línea control 1 y de las líneas 8 y 26 de <i>N. tabacum</i> cv, xanthi nc al día 3 después de la siembra, en medio con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio. Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ y (***) $P \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba de Tukey.	29
Figura 3. Crecimiento al día 5 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (100, 300 y 500 μM) de la línea control 1 y la línea 8.	30
Figura 4. Longitud de raíz (en mm) de la línea acigoto (control) y las transgénicas (L8 y L26) al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de Cloruro de Cadmio (100, 300 y 500 μM). Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ y (***) $P \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba de Tukey.	30
Figura 5. Longitud de tallo y raíz de la línea control 1 y las líneas 8 y 26 al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de Cloruro de Cadmio (100, 300 y 500 μM).....	31
Figura 6. Porcentaje de germinación del control acigoto y de las líneas 8 y 26 de <i>N. tabacum</i> cv, xanthi nc al día 2, después de la siembra, en medio con diferentes concentraciones de cloruro de aluminio. Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ y (***) $P \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba de Tukey.	31
Figura 7. Longitud de raíz (en mm) de la línea control y las líneas 8 y 26 al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de cloruro de aluminio (100, 150 y 300 μM). Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.	32
Figura 8. Efecto de las concentraciones 100 y 300 μM de cloruro de aluminio sobre la morfología de las raíces y la formación de pelos radiculares de las líneas control (L1) y transgénica (L8).....	32
Figura 9. Altura (en cm), diámetro de tallo (en mm) y contenido de clorofila en hoja joven (en $\mu\text{mol m}^{-2}$) de la línea 1 y de la línea 8 de <i>N. tabacum</i> cv, xanthi nc durante el periodo experimental de 31 días en etapa de plántula bajo el tratamiento de riego adicionando diferentes concentraciones de NaCl (a y b), AlCl_3 (c y d) y CdCl_2 (e y f). Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	35
Figura 10. Efecto de la concentración 600 mM de cloruro de sodio sobre el periodo de floración de las plantas de <i>N. tabacum</i> cv, xanthi nc de las líneas 1 y 8 al día 31.....	36
Figura 11. Efecto de la concentración 500 μM de cloruro de cadmio sobre el periodo de floración de las plantas de <i>N. tabacum</i> cv, xanthi nc de las líneas 1 y 8 al día 31.....	37
Figura 12. Efecto de la concentración 600 mM de cloruro de sodio sobre el periodo de floración de las plantas de <i>N. tabacum</i> cv, xanthi nc de las líneas control (L1) y transgénica (L8) al día 31.....	38

1. INTRODUCCIÓN

El estrés en plantas reduce de manera significativa el rendimiento de las cosechas cultivadas a nivel mundial. Se estima que el 42% de las pérdidas en rendimiento de los ocho cultivos más importantes en todo el mundo suceden a causa de los diversos tipos de estrés (Carvalhais et al., 2014). Entre ellos, el exceso de salinidad en los suelos afecta a más del 30% de los cultivos de riego y el 7% de la agricultura temporal en todo el mundo (Basit et al., 2016). Mientras que la contaminación del suelo por metales es hoy en día uno de los temas ambientales más urgentes que existen debido a que aproximadamente, el 50 % de la superficie cultivable del planeta tiene suelos ácidos (Zheng, 2010). Sumado a esto, basándose en el aumento de la población mundial y el consumo *per cápita*, se estima que la demanda de alimentos incrementará en un 40% para el año 2030 y en un 70% para el 2050 (Foresight, 2011). Por estas razones, la búsqueda de soluciones para minimizar las pérdidas por contaminación del suelo debe ser un asunto urgente a tratar por todas las naciones. Para hacer frente a esta amenaza, se han planteado diversas soluciones desde el ámbito científico. Una de ellas es la generación de cultivos genéticamente modificados que tengan la capacidad de adaptarse a condiciones ambientales adversas. Si la precisión de la edición genómica de las plantas de cultivo se optimiza y la tecnología se aprueba y es aceptada por las regulaciones, productores y consumidores esta herramienta puede contribuir a proteger la seguridad alimentaria y combatir los efectos que el cambio climático tiene sobre la agricultura (Scheben and Edwards, 2017) . El modelo transgénico de *Nicotiana tabacum* Xanthi nc que expresa el gen *CchGLP* fue diseñado como un modelo de expresión ideal para el estudio de los mecanismos implicados en las redes moleculares de defensa en las plantas. El gen *Capsicum chinense Germin-Like protein* (CchGLP), que fue identificado y caracterizado a partir de una colecta de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq BG-3821), codifica para una proteína de tipo germina (GLP) que mostró actividad enzimática de la manganeso superóxido

dismutasa (Mn-SOD) (Barrera-Pacheco et al., 2008). Se identificó que *CchGLP* es parte de las rutas de señalización del ácido salicílico y del etileno, por lo que tiene un rol activo en la respuesta de defensa de la planta (León-Galván *et al.*, 2011). Este modelo transgénico ha demostrado tener tolerancia a estrés causado por geminivirus, y a infecciones por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y *Fusarium oxysporum* (Guevara-Olvera et al., 2012; Ruiz Nito, 2009). También ha mostrado tener tolerancia a estrés abiótico, específicamente sequía (Cardenas-Manríquez et al., 2016). Este trabajo de investigación se llevó a cabo adoptando un enfoque molecular en combinación con parámetros fenotípicos con el fin de evaluar las respuestas de la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas de *N. tabacum* Xanthi no expresando el gen *CchGLP* bajo estrés por salinidad y por toxicidad por metales pesados.

2. MARCO TEÓRICO

Estrés por metales pesados

Entre los principales tipos de estrés abiótico que amenazan a las plantas, se incluye la toxicidad por metales pesados, que representa un riesgo muy importante debido a la no biodegradabilidad que presentan estos elementos, característica que conlleva a que permanezcan por periodos muy prolongados en el medio ambiente (Basit et al., 2016). Los suelos ácidos son el resultado de la descarga indiscriminada de metales pesados generados principalmente por actividades antropogénicas tales como procesos industriales, prácticas agrícolas modernas, drenaje ácido de las minas y desechos humanos. Las actividades geológicas naturales como la erosión del suelo y los volcanes constituyen, en menor medida, una fuente de estos elementos en los suelos (Alloway, 2013; Singh et al., 2015). La acidificación del suelo conlleva efectos negativos para las plantas debido a que disminuyen las concentraciones de macronutrientes (por ejemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+), y aumentan las concentraciones de metales pesados biodisponibles como Cd^{2+} , Cu^{2+} , As^{3+} y Pb^{2+} (Guo et al., 2014). El término “metales pesados” se refiere a cualquier elemento metálico o metaloide con una densidad atómica mayor a 4 g/cm^3 (o 5 veces mayor o más que la del agua) y que es tóxico aun a muy bajas concentraciones (Sreekanth, 2010). La toxicidad y biodisponibilidad de los metales pesados en suelos agrícolas depende fuertemente de sus formas químicas, que están influenciadas por el tipo de suelo, su pH, la capacidad de intercambio catiónico, los contenidos y tipos de minerales arcillosos, el contenido de materia orgánica, las condiciones redox y de los quelatos exudados por las raíces en la rizósfera (Guo et al., 2014). Los estudios acerca de los niveles de toxicidad de los metales dependiendo de sus formas químicas han demostrado que generalmente la forma intercambiable (Ex) es la más tóxica, mientras que en forma de residuos (Res) es la menos tóxica (Wang et al., 2008).

Se ha reportado que concentraciones tóxicas de metales pesados en el suelo resultan en la acumulación de éstos en diferentes partes de las plantas (Dubey et al., 2014). Dicha

acumulación representa un riesgo para la salud humana debido al posible consumo de estas plantas (Tchounwou et al., 2014). Los síntomas fenotípicos generalmente reportados debido a toxicidad por metales en plantas incluyen clorosis, enrollamiento de las hojas y malformaciones en raíz, sin embargo, el más evidente es la inhibición del desarrollo, causado por la reducción en procesos como la fotosíntesis, la respiración y la absorción de agua y nutrientes (Yue et al., 2016). El estrés por metales pesados también conduce a estrés oxidativo (Gill and Tuteja, 2011; Shri et al., 2009) y modula la expresión de genes (Chakrabarty et al., 2009). Diversos estudios sugieren que las plantas tolerantes a este tipo de estrés han desarrollado mecanismos moleculares que ayudan a regular la absorción de estos elementos (Dubey et al., 2014). En este sentido se ha encontrado que las fitoquelatinas (FQS), una clase de polipéptidos ricos en cisteína, se unen a los metales pesados formando complejos que ayudan a desintoxicar a través del secuestro del metal en vacuolas (Shukla et al., 2012). El glutatión (GSH), un importante antioxidante involucrado en la eliminación de radicales libres y H_2O_2 de las células vegetales, es el precursor de las FQS y varios estudios han reportado altos niveles de este antioxidante en tejidos vegetales bajo estrés por metales pesados (Shukla et al., 2012; Sun et al., 2007). También un gran número de genes que codifican para proteínas transportadoras se han reportado por expresarse diferencialmente, ya sea sobre expresados o reprimidos, bajo estrés por diferentes metales pesados. Entre estos se incluyen transportadores de membrana, transportadores de sulfato, transportadores de péptidos, transportadores de nitratos, transportadores ABC (del inglés ATP Binding Cassette), proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-Proteínas), transportadores de zinc, proteína Nramp6 (Natural-resistance-associated macrophage protein 6) con actividad transportadora de metales y proteínas transportadoras de la familia MATE (Dubey et al., 2014). Sin embargo, aún se desconoce bastante sobre las bases moleculares involucradas en la absorción y la desintoxicación de metales pesados por parte de las plantas.

Cadmio

El cadmio (Cd) es un elemento metálico no esencial para las plantas y altamente tóxico para todas las especies, incluso a concentraciones muy bajas. Su absorción se lleva a cabo muy fácilmente a través de las raíces de las plantas y es traslocado a los órganos aéreos de éstas, lo cual implica un riesgo por su incorporación a la cadena alimenticia (Greco et al., 2012; Guo et al., 2014; Yue et al., 2016). El Cd en su forma intercambiable y unido a carbonatos son las formas químicas más tóxicas para las plantas por su fácil movilidad y biodisponibilidad (Guo et al., 2014). El Cd es absorbido por las plantas a través de transportadores de Ca y Zn, debido a su similitud estructural con estos elementos (Himeno et al., 2009). En *A. thaliana* se han identificado también transportadores ABC, específicamente en pelos radiculares y la epidermis, involucrados en la absorción de Cd (Kim et al., 2007). Transportadores de zinc también se han reportado por tener un rol en el transporte del Cd al interior de la planta (Himeno et al., 2009). Una de las causas de la toxicidad por Cd consiste en que este elemento no permite que las plantas absorban micronutrientes esenciales para su desarrollo, como Zn, Fe y Mn, probablemente debido a la competencia por unirse a los transportadores específicos o por su interferencia en la regulación de la expresión de genes transportadores (Küpper and Kochian, 2010). Los efectos inducidos por Cd en plantas incluyen estrés oxidativo, genotoxicidad, inhibición del aparato fotosintético e inhibición del metabolismo de las raíces (Andresen and Hendrik, 2013). En diversos estudios las plantas tratadas con Cd han mostrado longitud reducida de sus raíces y deformación y oscurecimiento de las mismas. Este daño perturba el estado hídrico de la planta ocasionando el marchitamiento de la misma (Perfus-barbeoch et al., 2002). Sin embargo, en plantas tolerantes se ha mostrado que las raíces son la primera barrera contra el Cd. La expresión de peroxidasas se ha relacionado con el proceso de lignificación de la endodermis de las raíces formando hasta cierto punto una barrera de paredes celulares como respuesta para evitar el transporte de Cd dentro de la planta (Cuypers et al., 2002). Se ha llegado a la conclusión de que la fitotoxicidad de los metales se

debe en menor o mayor medida al estrés oxidativo causado por éstos. Si las especies reactivas del oxígeno (ROS), causadas por el estrés, no se desintoxican inmediatamente, éstas pueden conducir a la peroxidación de lípidos, causando oxidación de las membranas (Andresen and Hendrik, 2013). En diversos estudios se ha demostrado la expresión o actividad de enzimas antioxidantes como efecto directo de la exposición a Cd en plantas tolerantes (Iannone et al., 2010). Sin embargo, en general se ha visto que bajas concentraciones de Cd con tratamientos de duración corta de tiempo generalmente sobre expresan el sistema antioxidante (Saidi et al., 2013), mientras que una exposición más larga de tiempo y mayores concentraciones de la sal conducen a una disminución de la actividad antioxidante en las plantas tolerantes (Sandalio et al., 2001) Sin embargo, las concentraciones más bajas de Cd y la duración más corta del tratamiento generalmente aumentaron bastante el sistema antioxidante (Saidi et al., 2013), mientras que una exposición más larga y mayores concentraciones de Cd condujeron a una disminución de la actividad o del contenido de los antioxidantes (Sandalio et al., 2001). Algunas de las soluciones, propuestas desde el ámbito científico, a estos tipos de estrés incluyen la aplicación exógena de Calcio para proteger a las plantas y otorgarles resistencia al estrés por Cadmio (Huang et al., 2017).

Aluminio

El aluminio (Al) es uno de los tres elementos más abundantes en la corteza terrestre, por ello se le considera como el factor más importante que limita el crecimiento de las plantas en suelos ácidos (Ciamporova, 2002; Kochian et al., 2004; Zhao et al., 2014). Curiosamente, los trabajos experimentales que estudian la toxicidad por Al, reportan una gran variedad de resultados, dependiendo de la especie de planta, la concentración de Al utilizada, la duración de la exposición y las condiciones de crecimiento (Delhaize and Ryan, 1995; Kochian et al., 2005). Sin embargo, es probable que el factor más importante que determina la toxicidad del Al es la forma química del elemento en la rizosfera. No todas las formas químicas del Al

disuelto en el suelo tienen los mismos efectos tóxicos en las plantas. Su forma más tóxica se genera en suelos ácidos ($\text{pH} < 5,0$) ya que el elemento se solubiliza y se convierte en su catión trivalente Al^{3+} , también conocido como intercambiable. Esta forma es más nociva para las plantas como resultado de su fácil movilización en el suelo y fácil absorción por las plantas (Guo et al., 2014; Matsumoto, 2000). El Al en su forma iónica de primera instancia causa la inhibición del alargamiento de las raíces destruyendo la estructura celular del ápice de este órgano, afectando la absorción de agua y nutrientes del suelo por las raíces (Zheng, 2010). Como consecuencia de la alteración del equilibrio hídrico y la asimilación de nutrientes, el crecimiento y desarrollo de las plantas se ve seriamente comprometido. La mayoría de los estudios coinciden en que el efecto primario bajo estrés por aluminio en plantas resulta en grandes cambios en la morfología de las raíces (Delhaize and Ryan, 1995; Kochian et al., 2005). Los síntomas reportados incluyen hinchazón de los ápices de las raíces, engrosamiento de las raíces, poco o nada desarrollo de pelos radiculares, alteraciones de los tejidos periféricos de las raíces y nacimiento de raíces laterales más cerca de la punta de la raíz (Ciamporova, 2002; Kochian et al., 2005). Algunas plantas han desarrollado mecanismos de resistencia a altas concentraciones de cationes de aluminio y generalmente se dividen en aquellas que excluyen los cationes Al^{3+} de sus tejidos (resistencia) y aquellas que pueden albergar de forma segura los cationes una vez que éstos ya fueron absorbidos por la planta (tolerancia) (Pereira et al., 2010). La resistencia de plantas tolerantes a Al ha sido estudiada a nivel fisiológica, bioquímica y, más recientemente, a nivel molecular. En este sentido, se ha encontrado que las modificaciones en las propiedades de unión al apoplasto de las raíces contribuyen a la resistencia al Al, debido a que el apoplasto es el primer compartimento de la raíz que tiene contacto con especies de aluminio presentes en el suelo (Zheng, 2010). Varios estudios han confirmado la participación en la resistencia a Al de genes pertenecientes a la familia denominada MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion), que codifican para

transportadores de aniones orgánicos que funcionan de bombas de eflujo (Furukawa et al., 2007; Liu et al., 2009; Magalhaes et al., 2007). Otro tipo de proteínas pertenecientes a la familia denominadas ALMT han mostrado tener un papel muy importante como bombas de eflujo de malato durante la resistencia a Al (Liu et al., 2009; Ryan et al., 2009).

Estrés por salinidad

La salinidad es uno de los principales factores abióticos que afectan el crecimiento y los rendimientos de los cultivos. Las concentraciones altas de salinidad en los suelos agrícolas son producto de eventos geológicos o de prácticas irregulares en la agricultura, como el riego con aguas saladas y el exceso en la utilización de fertilizantes (Jovelina et al., 2017). Altos niveles de salinidad inhiben la germinación y perturban el equilibrio iónico y osmótico de las células, debido a la acumulación de iones de Na⁺ y Cl⁻ (Mahajan and Tuteja, 2005). El potencial hídrico del suelo disminuye en presencia de altos niveles de salinidad, lo cual para las plantas se traduce en la dificultad de absorber el agua y los nutrientes (Mahajan and Tuteja, 2005). Las respuestas fisiológicas de las plantas ante estrés por salinidad son a menudo complejas y multifacéticas. Ésta respuesta se puede describir, de forma muy básica, en dos principales etapas: en los primeros minutos a días ocurre la respuesta relacionada con la detección de los iones independientes de Na⁺ y la consecuente señalización (Gilroy et al., 2014; Roy et al., 2014). En esta primera fase los efectos de la salinidad en el estado hídrico de la planta puede ocasionar el cierre de estomas y la inhibición del crecimiento del área foliar de las hojas (Negrão et al., 2016). La producción de ROS (tales como peróxido de hidrógeno H₂O₂, radical hidroxilo OH y anión superóxido O₂⁻) provoca una explosión oxidativa, que puede ser muy dañina para la planta si ésta no controla los niveles de éstos compuestos (Jovelina et al., 2017). La segunda fase se desarrolla durante un periodo más largo, que dura de días a semanas, e implica la acumulación de iones Na⁺ en los tejidos, de forma particular en las hojas viejas, causando la prematura senescencia de las mismas y en última instancia rendimientos bajos o incluso la muerte de la planta (Munns and Tester, 2008). Las plantas

tolerantes a salinidad han adoptado diferentes mecanismos de defensa. Munns y Tester (2008) los clasificaron en tres: la exclusión definitiva de los iones Na^+ fuera de los tejidos de las plantas, la compartimentación de los iones tóxicos en tejidos, células y orgánulos celulares específicos y la capacidad de crecimiento y absorción de agua del suelo independientemente de la acumulación de Na^+ en los tejidos de la planta.

A nivel bioquímico y molecular se han identificado compuestos y genes que juegan un papel importante en la tolerancia a la salinidad. La prolina es un aminoácido importante para el equilibrio osmótico en plantas, que ha mostrado ser esencial en el metabolismo primario durante estrés salino e hídrico (Brini et al., 2007). El rol de genes que codifican para receptores de quinasas (RLK) durante condiciones de salinidad se ha confirmado como crucial en la transducción de señales (Kumar et al., 2013). De igual manera, se ha encontrado que otro tipo de proteínas denominadas quinasas activadas por mitógenos (MAP) son cruciales en la respuesta a estrés salino (Ouyang et al., 2010).

Metilación del ADN

Las modificaciones epigenéticas que inciden sobre los genomas de las plantas ayudan a regular su crecimiento y reproducción, y se ha encontrado que son importantes en procesos de respuesta a estrés (Feng and Jacobsen, 2011). La metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es una de las modificaciones epigenéticas más importantes y conservadas en diversos organismos eucarióticos y se refiere a la adición de un grupo metilo a las bases de citosina del ADN para formar 5-metilcitosina (Song et al., 2017). Las plantas tienen marcas epigenéticas que son exclusivas de ellas, es decir que no comparten con otros organismos como animales y hongos (Feng and Jacobsen, 2011). En las plantas, las citosinas pueden metilarse bajo una variedad de contextos de secuencias de ADN, que se pueden clasificar en tres: CG, CHG y CHH, donde H representa cualquier nucleótido excepto la guanina (H=A, T, C) (He et al., 2011; Law and Jacobsen, 2010). *Arabidopsis* es probablemente el organismo con el metiloma

más extensamente caracterizado y se ha encontrado que en su genoma la metilación del ADN se acompaña muy frecuentemente de siRNAs (Feng and Jacobsen, 2011; He et al., 2011). Esto sugiere que los siRNAs juegan un papel muy importante en la metilación del ADN. Mientras que la hipermetilación en general se correlaciona con la inactividad del gen, la hipometilación, en sitios específicos o en regiones específicas, se correlaciona con la transcripción activa. En las plantas, la hipometilación inducida experimentalmente se ha correlacionado con una serie de cambios fenotípicos.

Plantas transgénicas

En la actualidad se conocen métodos eficientes de transformación en aproximadamente 120 especies de por lo menos 35 familias diferentes. La transformación genética de plantas se ha convertido en una herramienta experimental muy útil para el estudio de algunas hipótesis relacionadas a la fisiología vegetal, que de otra forma serían sumamente difíciles de probar (Birch, 1997). El uso de esta tecnología ha permitido identificar los roles de algunos genes que expresan proteínas estructurales y regulatorias y que activan la cascada de rutas de señalización en respuesta al estrés (Vij and Tyagi, 2007). La mayoría de estas investigaciones se han llevado a cabo en modelos transgénicos de *Arabidopsis* y tabaco (Bajaj and Mohanty, 2005).

Los cultivos biotecnológicos producen beneficios ambientales y socio económicos sostenibles y de importancia. Los cultivos modificados genéticamente (GM) ocupan un área de más de 160 millones de hectáreas cultivadas por millones de productores de 29 países del mundo. De los 29 países en 2011, 19 eran países en desarrollo y 10 eran países industrializados. Los GM son utilizados por 7 millones de productores en China y otros 7 millones en India. EEUU continúa siendo el principal productor de cultivos GM (Gutiérrez et al., 2015)

Tabaco como modelo transgénico

Nicotiana tabacum es miembro de la familia Solanaceae, que también incluye al tomate, papa, y chile entre otros cultivos de importancia agrícola. Fue originalmente estudiada debido a su

importancia económica pero su utilización para el estudio biológico de las plantas comenzó cuando se convirtió en la primera planta genéticamente modificada en 1983 (Edwards *et al.*, 2010). Un modelo biológico ideal para el estudio de mecanismos moleculares en plantas requiere que sea fácil de modificar y regenerar genéticamente (eficiencia de transformación mayor a 80%), que se cuente con mucha información en las bases de datos mundiales para llevar a cabo comparaciones, y que tenga una tasa de crecimiento rápido (entre 1 y 2 meses) (Goodin *et al.*, 2008; Bombarely *et al.*, 2012; Junping *et al.*, 2014; Edwards *et al.*, 2010). *Nicotiana Tabacum* es un organismo ideal para el estudio de algunas funciones biológicas básicas, como la interacción planta-patógeno, la respuesta al ambiente, la regulación del crecimiento y la fase de senescencia (Veluthakkal and Dasgupta, 2015).

Proteínas tipo germina (GLPs) y defensa de la planta

Las proteínas germina y tipo germina (GLPs) están codificadas por una familia de genes existentes en todas las plantas. Pertenecen a la superfamilia de las cupinas, que agrupa diversas proteínas que comparten una estructura terciaria conservada, aunque con una limitada similitud en su secuencia primaria (Dunwell *et al.*, 2008). La expresión de ciertas GLPs se ha asociado a una variedad de estados específicos del desarrollo de las plantas como la embriogénesis e inducción floral, pero particularmente ante diferentes tipos de estrés biótico y abiótico como exposición a altas concentraciones de sales, metales o altas temperaturas (Khuri *et al.*, 2001; Schafleitner y Wilhelm., 2002; Park *et al.*, 2004). La primera evidencia sobre la inducción de la expresión de GLPs debido a estrés abiótico se reportó en un estudio por estrés salino en raíces de cebada (Dunwell *et al.*, 2000). Se ha reportado que diversas GLPs expresan actividad de la superóxido dismutasa (SOD) que convierte aniones superóxido en peróxido de hidrógeno (H₂O₂), una molécula implicada en la respuesta de defensa de las plantas. (Davidson *et al.*, 2009).

CchGLP

Se estudió el perfil de expresión de genes de una colecta de plantas de Chile habanero

(*Capsicum chinense* Jacq.), específicamente la colecta denominada BG-3821 del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Gasca-González *et al.*, 2008; Barrera-Pacheco *et al.*, 2008). Esta colecta de chile habanero es proveniente de la Península de Yucatán, de donde fue recolectada en su forma silvestre para fines de un estudio que evaluó varias poblaciones de esta especie y se buscó identificar plantas que mostraran una adecuada resistencia viral, específicamente a infecciones por el virus PHYVV. Posteriormente se probó que plantas pertenecientes a la colecta BG-3821 además de mostrar rasgos de resistencia a infección simple, también se mostraron asintomáticas ante infección mixta de PHYVV y PepGMV (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003).

La expresión transcripcional, inducida bajo diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, que se analizó en *Capsicum chinense* BG-3821, permitió identificar varios genes candidatos a estar involucrados en la respuesta de resistencia de éstas plantas (Barrera-Pacheco *et al.*, 2008). Dentro de éstos se reportaron el gen *R-52* y el *R-100* que presentaron similitud con genes que codifican para proteínas tipo germina. Debido a que se sabe que se puede inducir la expresión del sistema defensivo de las plantas mediante el uso de elicitores (moléculas inocuas a los vertebrados y el medio ambiente) (Mejía-Teniente *et al.*, 2013), se hizo aplicación de ácido salicílico en las plantas evaluadas. Este elicitor abiótico resultó ser un fuerte inductor de la expresión de los genes reportados en interacciones incompatibles, confirmando su participación en la respuesta sistémica adquirida en la planta. En un estudio complementario se hizo evidente la inducción del gen correspondiente a la clona *R-100* en plantas inoculadas con el PHYVV mientras en plantas control el nivel de expresión fue comparativamente inferior (Gasca-González *et al.* 2008).

Posteriormente la clona *R-100*, expresada diferencialmente, se catalogó como el gen *Capsicum chinense Germin Like Protein CchGLP*. Las características reportadas a partir de la

secuenciación de esta proteína, junto con las reportadas por un análisis bioinformático de esta secuencia confirmaron su similitud con otras GLPs. Se probó que su secuencia consiste de 203 aminoácidos y que una sola copia de este gen está presente en el genoma de *Capsicum chinense* BG-3821. Del análisis bioinformático se identificó en la *CchGLP*, el dominio propio de las cupinas y 3 regiones altamente conservadas llamadas cajas germina A, B y C (Lu *et al.*, 2010). Una de las cajas conteniendo tres residuos de histidina y un residuo de glutamato. Además, se identificó una señal secretora en los primeros 18 aminoácidos del extremo N-terminal, así como un sitio de N-glicosilación del residuo 44 al 47 (León-Galván *et al.*, 2011). Así mismo se analizó la actividad enzimática de la *CchGLP*, encontrando actividad de la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD). La superóxido dismutasa es una enzima capaz de convertir al radical superóxido (O₂⁻) en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Bonilla *et al.*, 2002), el cual activa o inactiva proteínas involucradas con transducción de señales para la expresión de genes relacionados con tolerancia a diversos tipos de estrés incluyendo estrés oxidativo, hídrico y derivado de patógenos (Apel y Hirt., 2004; Pitzschke *et al.*, 2006). El gen *CchGLP* mostró ser inducido durante interacciones incompatibles (con PepGMV y PHYVV) y al aplicar elicitores biológicos, deduciendo que la producción de peróxido de hidrógeno es resultado, ya sea de la ruta de señalización del ácido salicílico o por la del etileno (León-Galván *et al.*, 2011).

Tabaco transgénico al gen CchGLP

Se confirmó el rol de *CchGLP* en el sistema de defensa de las plantas contra infección por geminivirus, a través de un estudio que evaluó la resistencia de planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* cultivar *Xanthi nc*) expresando el *CchGLP* (Guevara-Olvera *et al.*, 2012). La metodología empleada para la obtención de las plantas transgénicas de *N. Tabacum* se llevó a cabo por Ruíz-Nito en 2009 (Figura 1). El primer paso fue la construcción entre el promotor CaMV35S y la secuencia completa de *CchGLP* dentro del vector binario pBI121 (Figura 1.A). La construcción pBI121-*CchGLP* se introdujo por electroporación a *Agrobacterium*

tumefaciens PGV2260 (Figura 1.B). La cepa obtenida se usó para inocular explantes foliares de tabaco (Figura 1.C) los cuales se transfirieron, después del co-cultivo, a un medio específico para la generación de brotes (Figura 1.D) y posterior a la selección de los explantes transformados, se pasaron a otro medio que permitió la generación de la planta completa (Figura 1.E). Se realizó transcripción reversa de plantas de tabaco transgénicas y control para comparar por densitometría óptica el nivel de transcrito correspondiente al transgén *CchGLP*. Antes y después de la infección viral, se determinó histológicamente la presencia de peróxido de hidrógeno. En estadios tempranos, se observó una diferencia marcada en el fenotipo de las plantas transgénicas en comparación con las plantas control debido a una sobreproducción de peróxido de hidrógeno.

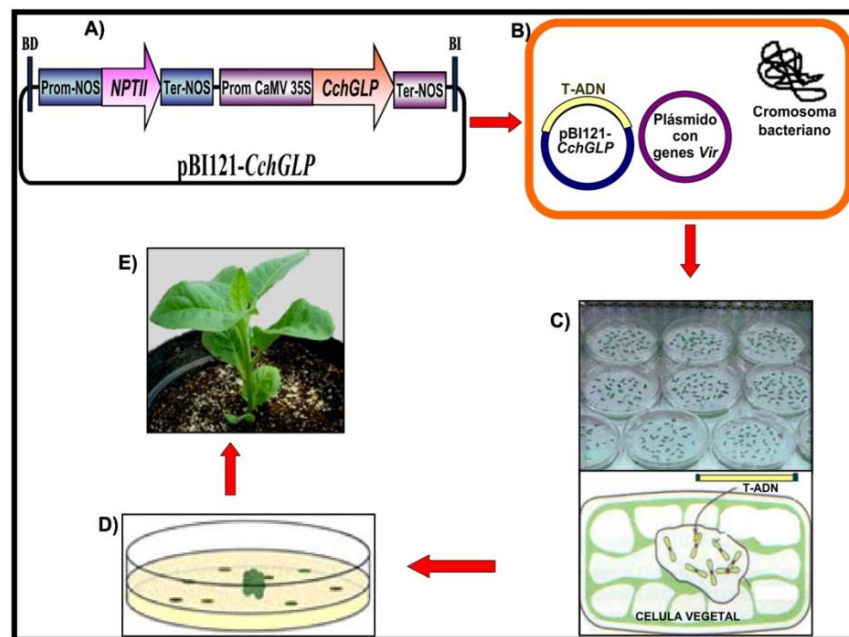


Figura 1. Metodología empleada para la obtención de las plantas transgénicas de *N. tabacum* (Ruíz-Nito, 2009)

Se caracterizaron 6 líneas de tabaco transgénicas, las cuales mostraron un desarrollo y crecimiento idénticos a la planta sin transformar. Las líneas mostraron diferentes niveles de expresión, 4 de ellas (líneas 8,9,25 y 26) presentaron un nivel muy similar en transcrito. Sin embargo, se encontró que para una de las líneas (línea 1) aunque hubo amplificación que

indicó la presencia del transcrito, el nivel de expresión del transgén fue nulo, una posible causa es que el *CchGLP* se integró en una zona del genoma que impidió su libre transcripción (Guevara-Olvera *et al.*, 2012; Ruíz-Nito., 2009)

La planta de *Nicotiana tabacum* transgénica asegura producción endógena y uniforme de peróxido de hidrógeno comparada con la planta silvestre. Además, se indujeron algunos genes relacionados a la resistencia sistémica adquirida (SAR) específicamente los genes *fenilalanina amonio liasa (PAL)* y *proteína relacionada con la patogénesis 1^a (PR-1a)* (Guevara-Olvera *et al.*, 2012). Este modelo de expresión es ideal para determinar los elementos diferenciales involucrados en las redes moleculares de defensa. Lo anterior en base a que se ha demostrado que presenta tolerancia ante infecciones por geminivirus (Guevara-Olvera *et al.*, 2012), a infecciones por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, *Fusarium oxysporum* y estrés hídrico (Cardenas-Manríquez *et al.*, 2016).

3. MOTIVACIÓN

Las sales metálicas en los suelos agrícolas inhiben el desarrollo óptimo de las plantas, por lo que se están realizando esfuerzos biotecnológicos para desarrollar especies tolerantes a dicho estrés. Para lograr lo anterior, es necesario comprender, a nivel molecular, los efectos de la toxicidad de los elementos contaminantes, así como los mecanismos de tolerancia de las plantas. Este conocimiento tiene como finalidad avanzar en el mejoramiento genético de cultivos importantes para lograr aumentar el rendimiento en los suelos menos productivos. Esto resulta necesario ya que al año 2050 la población del planeta llegará o superará los 9.000 millones de habitantes.

4. HIPÓTESIS

La expresión del gen *CchGLP* de chile habanero en tabaco (*Nicotiana tabacum* spp) confiere tolerancia a condiciones de salinidad y toxicidad por metales pesados debido a la inducción de genes de respuesta a este estrés comparando con el control acigoto de la misma.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Probar que el gen *CchGLP* en planta de tabaco le confiere tolerancia a estrés por salinidad y metales pesados comparando con el control acigoto.

Objetivos particulares

- Determinar la respuesta diferencial fenotípica a estrés por salinidad y metales pesados de la planta transgénica altamente expresiva considerando el control acigoto de la misma en etapa de germinación y estadios tempranos.
- Determinar los patrones de metilación del ADN en los tratamientos contrastantes de tolerancia a los estreses evaluados en etapa de germinación.
- Determinar la respuesta diferencial fenotípica a estrés por salinidad y metales pesados de la planta transgénica altamente expresiva considerando el control acigoto de la misma en etapa de plántula.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Material vegetal y germinación

Se utilizaron semillas de *Nicotiana tabacum* c.v. xanthi nc de tres líneas que presentan distintos niveles de expresión del transgén *CchGLP*. La transformación genética, la propagación de las plantas *in vitro* y la obtención de semillas se llevaron a cabo por Ruiz Nito en 2009. La línea 1 se utilizó como control ya que es acigótica (el transgén se integró en una parte del genoma que impidió su libre expresión) y las líneas 8 y 26 fueron utilizadas debido a que presentan un nivel alto de expresión del transgén. Para todos los experimentos realizados las semillas fueron esterilizadas por sumersión en etanol 70% por 2 minutos, seguido por sumersión en una solución de hipoclorito de sodio al 50% con Tween 20® al 0.1% por 7 minutos y mínimo tres lavados con agua destilada estéril en campana de flujo laminar.

Para todos los experimentos en etapa de germinación las semillas fueron sembradas en placa Petri de 90 mm, desechable y estéril con 20 semillas cada una. Para los experimentos en etapa de plántula las semillas se sembraron en frascos de vidrio de 100 ml de boca ancha con tapa rosca previamente esterilizados y posteriormente las plantas fueron trasplantadas. Se utilizó medio MS (Murashiage-Skoog) como medio de cultivo. Las condiciones de germinación fueron las mismas para todos los experimentos: temperatura ambiente y un fotoperiodo de 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad.

Métodos

Determinación de la respuesta diferencial fenotípica en etapa de germinación y estadios tempranos.

Se realizó propagación *in vitro* en medio de cultivo MS con adición de tres distintas concentraciones de aluminio y cadmio en sus formas $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50, 150 y 300 μM) y CdCl_2 (100, 300 y 500 μM) respectivamente. Los platos fueron monitoreados todos los días a la misma hora hasta que no se observó más germinación (aparición de radículas) y después se

calculó el porcentaje de germinación por día. Al día 16, después de la siembra, los platos fueron abiertos para poder extraer las plantas y se midió la longitud de las raíces de 10 plantas por tratamiento utilizando un Vernier digital. Además, se tomaron fotografías de las raíces utilizando un microscopio Binocular BioBlue de Euromex a 4x para observar las diferencias en el desarrollo de pelos radiculares bajo los distintos tratamientos.

Determinación de los patrones de metilación del ADN en etapa de germinación.

Se recolectó tejido de plántulas, de la línea transgénica (L8) y de la línea control (L1), que se expusieron a concentraciones de 100, 150 y 300 μM de AlCl_3 y 100 y 500 μM de CdCl_2 en etapa de germinación. Fueron congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C . Se llevó a cabo extracción de ADN genómico de la siguiente manera: Se molieron en un mortero usando nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino, 100 mg de cada muestra tratada y después se mezclaron con 750 μl de buffer CTAB. Las muestras fueron sometidas a vortex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 750 μl de cloroformo:alcohol isoamílico (24: 1) seguido por vortex y una centrifugación a 12.000 RPM durante 5 min a 4°C . La capa superior o fase acuosa se eliminó con ayuda de una micropipeta, se transfirió a un nuevo tubo cónico de polipropileno y se mezcló con 2/3 de su volumen de isopropanol al 100% y 1/10 de su volumen de acetato sódico 5 M. Después de una incubación de 10 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12.000 RPM durante 5 min a 4°C . A continuación, el sobrenadante se desechó y el sedimento de ADN obtenido se lavó con 1 ml de etanol enfriado al 70% y se sometió a vortex suave. Las muestras se centrifugaron de nuevo a 7.500 RPM durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se desechó. Las pastillas se secaron al aire y se resuspendieron en 50 μl de agua destilada tratada con DEPC. El ensayo de porcentaje de metilación se llevó a cabo siguiendo el protocolo incluido en el manual de instrucciones del Kit de ELISA de ADN de 5 mC de ZYMO RESEARCH (ANEXO 2) que funciona básicamente detectando y cuantificando 5-metilcitosina en las muestras de ADN mediante un

anticuerpo monoclonal (Anti-5-Metilcitosina). La relación de la densidad de dinucleótidos CpG / longitud del genoma utilizada fue aquel para *Arabidopsis thaliana*, 0,022, dando una diferencia de pliegue de 3,409.

Determinación de la respuesta diferencial fenotípica en etapa de plántula.

Cuando las plántulas tuvieron aproximadamente 2 meses de edad (del 6 de abril al 2 de junio) se consideró que estaban lo suficientemente grandes para aguantar el trasplante. Se utilizó como sustrato peat moss en bolsas de cultivo de 15 x 15 cm. Se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y riego diario con solución nutritiva al 40%. Se dejó transcurrir un mes a partir del trasplante y en ese momento se empezaron a aplicar los tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de tratamientos de aplicación

Tratamiento	Descripción	Concentración	Repeticiones	Unidad Experimental
Control	RD+SN	-	3	3
T1	RD+ SN+NaCl	300 mM	3	3
T2		600 mM	3	3
T3	RD+ SN+AlCl	150 μ M	3	3
T4		300 μ M	3	3
T5	RD+ SN+CdCl	100 μ M	3	3
T6		500 μ M	3	3

RD= Riego Diario, SN= Solución Nutritiva

El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar con una unidad experimental de 3 plantas por tratamiento y 3 repeticiones. El vigor de la planta fue determinado cada tercer día durante el tiempo que duró el experimento (31 días) a través de medir la altura de la planta, medir el diámetro basal del tallo y medir cantidad de clorofila en hoja joven. Se utilizó el medidor Chlorophyll meter SPAD-502 de Minolta y posteriormente la ecuación desarrollada por Markwell et al. (1995)

$$Chl (\mu mol m^{-2}) = 10^{M^{0.265}}$$

(en donde M es el valor arrojado por el medidor) para obtener el valor del contenido de clorofila.

Cuando finalizó el experimento se determinó el peso fresco y seco de la parte vegetativa y de las raíces.

Análisis estadísticos

Las diferencias entre los valores obtenidos de los ensayos fenotípicos y moleculares se calcularon a través de un análisis ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey a un nivel de significancia de 0.05, utilizando el programa computacional GraphPad PRISM 6. Todos los resultados se presentan como media \pm error estándar (SE) de tres repeticiones.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la respuesta diferencial fenotípica en etapa de germinación y estadios tempranos.

Los resultados mostraron que la tasa de germinación de las líneas transgénicas L8 y L26 fue mayor que la de la línea de control L1 en las tres diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (Fig. 2). Las diferencias fueron altamente significativas especialmente para la línea 8.

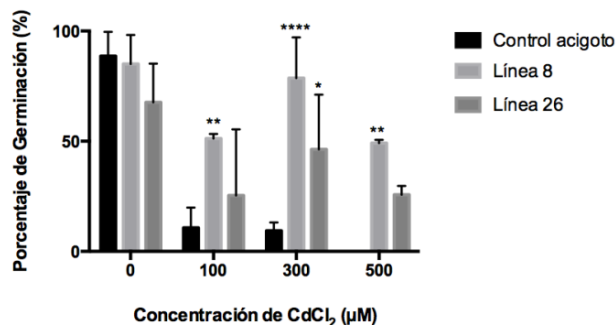


Figura 2. Porcentaje de germinación de la línea control 1 y de las líneas 8 y 26 de *N. tabacum cv. xanthi nc* al día 3 después de la siembra, en medio con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio. Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ y (****) $P \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Los aumentos en la concentración de cadmio en el medio dieron lugar a una disminución drástica de la tasa de germinación en las plantas de la línea control y la inhibición del crecimiento y desarrollo de las plántulas germinadas fue evidente bajo las concentraciones 300 y 500 µM de la sal. La Figura 3 muestra que las plántulas de la línea L8 se mostraban más vigorosas que las plantas de la línea 1 al día 5 después de la siembra. La longitud de la raíz de las plantas transgénicas fue mayor que la de las plantas de la línea control 16 días después de la siembra (Fig. 4). Bajo la concentración de cadmio de 100 µM, el desarrollo de las plantas transgénicas se mostró normal y sin síntomas de estrés, incluso algunas de las plantas ya tenían hojas verdaderas. La figura 5 confirma este hecho, sin embargo, al aumentar la concentración a 300 y 500 µM, comenzamos a notar síntomas de estrés en las plantas transgénicas, especialmente el oscurecimiento y malformación de las raíces fue evidente en algunas de ellas. El daño fue más drástico para la línea control, en la misma figura se puede observar que bajo la concentración de 100 y 300 µM de la sal, el crecimiento es severamente inhibido, presentando muchas hojas enrolladas y malformación muy evidente en el ápice de la raíz. A la concentración de 500 µM las plantas mostraron completa inhibición del desarrollo. Los resultados de la germinación bajo el estrés por aluminio (Al) mostraron un

comportamiento que ya ha sido anteriormente reportado que es que el aluminio en el medio promueve la aceleración de la emergencia de la radícula. Al día 2 después de la siembra, las semillas en medio sin sal no mostraron germinación, sin embargo, bajo las concentraciones de 100, 150 y 300 μM , todas las líneas mostraron ya aparición de radícula en este día.

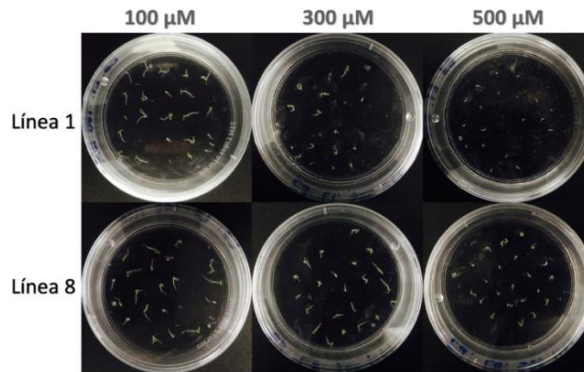


Figura 3. Crecimiento al día 5 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (100, 300 y 500 μM) de la línea control 1 y la línea 8.

La línea transgénica L8 mostró mayor porcentaje de germinación bajo las diferentes concentraciones (Fig. 6). La longitud de la raíz no fue un factor que mostrara diferencias significativas entre las plantas de la línea control y las plantas transgénicas, excepto para las plantas de la línea 8 bajo la concentración de 100 μM (Fig. 7). Como la longitud de la raíz no mostró diferencias significativas, decidimos estudiar bajo observación microscópica las raíces de las plantas de la línea 1 y línea 8 que crecieron bajo las concentraciones más bajas (100 μM) y más altas (300 μM) de Aluminio. No se encontraron grandes diferencias en el vigor de las raíces bajo la concentración de 100 μM entre las dos líneas, sin embargo, las raíces de la línea 1 mostraron malformaciones en la punta, hinchazón de la misma y nula presencia de pelos radiculares.

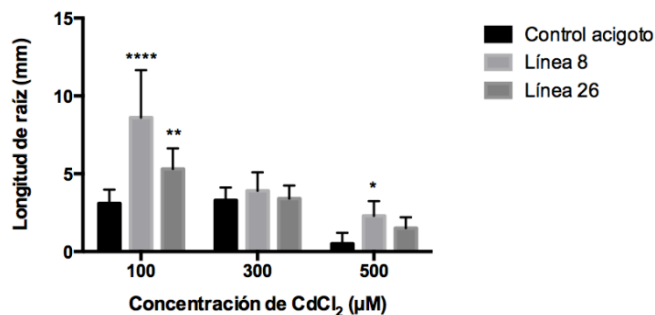


Figura 4. Longitud de raíz (en mm) de la línea acigoto (control) y las transgénicas (L8 y L26) al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de Cloruro de Cadmio (100, 300 y 500 μM). Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ y (***) $P \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Las raíces de la línea 8 bajo la misma concentración fueron más vigorosas y mostraron crecimiento normal de pelos radiculares (Figura 8).

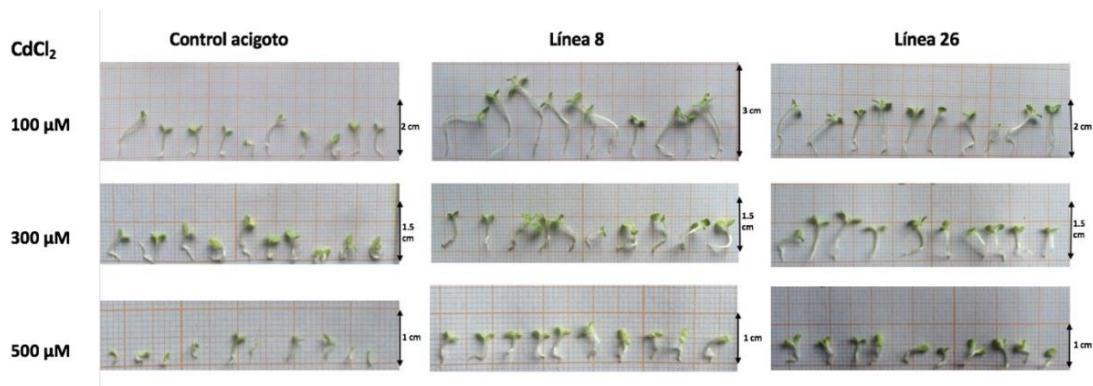


Figura 5. Longitud de tallo y raíz de la línea control y las líneas 8 y 26 al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de Cloruro de Cadmio (100, 300 y 500 µM)

Los resultados confirmaron que incluso si las líneas transgénicas L8 y L26, ambas sufrieron el proceso de transformación y expresan el transgén CchGLP, se comportan de manera distinta bajo condiciones adversas de crecimiento. Esto nos traduce que el transgén actúa de forma diferente, dependiendo del sitio al que se haya insertado en el genoma de la planta. Se puede deducir que al menos bajo estrés por cadmio y aluminio, las plantas de la línea 8 son más tolerantes que aquellas de la línea 26.

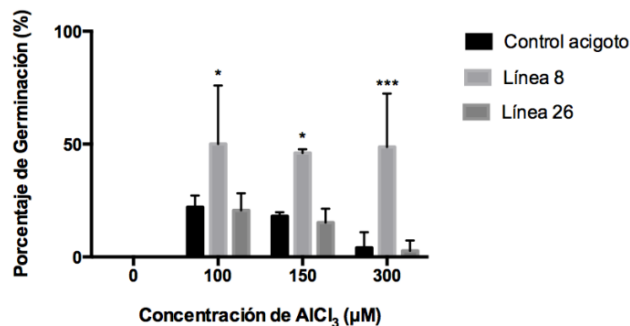


Figura 6. Porcentaje de germinación del control acigoto y de las líneas 8 y 26 de *N. tabacum* cv. *xanthi nc* al día 2, después de la siembra, en medio con diferentes concentraciones de cloruro de aluminio. Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ y (***) $P \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

También se demostró claramente que el efecto del Cd sobre la germinación y el desarrollo de las plántulas depende de su concentración y difiere mucho entre las líneas transgénicas y las de control, siendo las líneas transgénicas más tolerantes bajo este tipo de estrés.

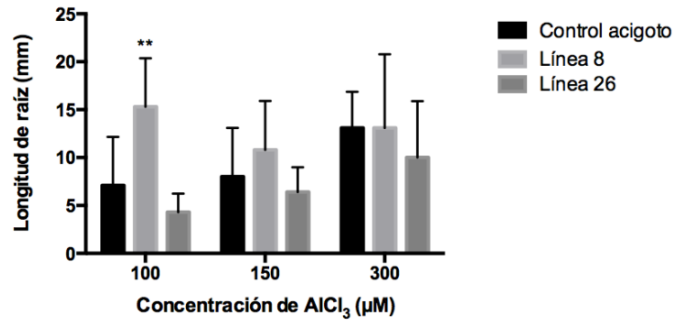


Figura 7. Longitud de raíz (en mm) de la línea control y las líneas 8 y 26 al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de cloruro de aluminio (100, 150 y 300 µM). Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Esto no fue necesariamente cierto para el estrés por aluminio, al menos en la longitud de la raíz, sin embargo, se encontraron diferencias en el vigor de las raíces, siendo las plantas transgénicas más resistentes a nivel de la raíz. Definitivamente se encontró que el estrés por Cadmio es más agresivo para las plantas que el estrés por Aluminio y que las plantas de la línea 8 lo toleran mejor.

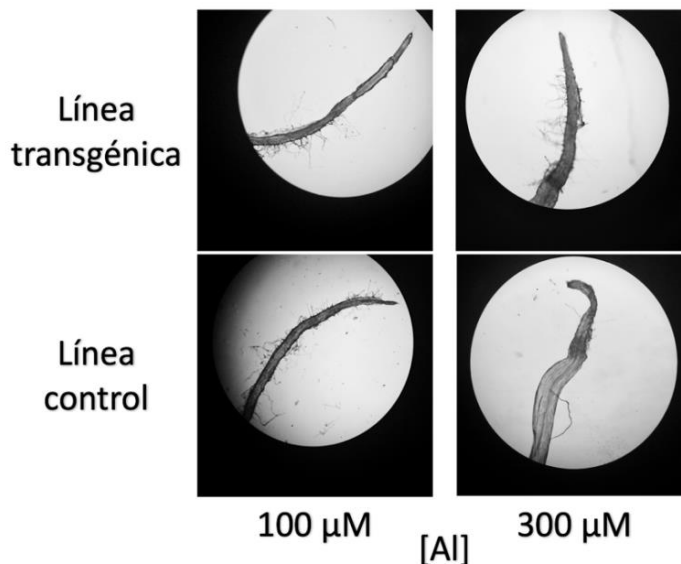


Figura 8. Efecto de las concentraciones 100 y 300 µM de cloruro de aluminio sobre la morfología de las raíces y la formación de pelos radiculares de las líneas control (L1) y transgénica (L8).

Determinación de los patrones de metilación del ADN en etapa de germinación.

Se cuantificó el porcentaje de metilación del ADN, en etapa de germinación, de las líneas 1 y 8, ya que esta última línea mostró ser la más resistente entre las dos líneas transgénicas utilizadas en los ensayos fenotípicos en este experimento. El kit utilizado midió la metilación en sitios CG del genoma exclusivamente en hoja, quedando excluidas las secuencias CHG y CHH metiladas y los demás órganos de la planta, por lo tanto, el porcentaje global de metilación no puede ser determinado. Sin embargo, en los resultados obtenidos (cuadro 2) se encontraron patrones definidos a pesar de que mostraron porcentajes de metilación que variaron entre 3% y 10%. Se encontró que el porcentaje de metilación aumentó para la línea 1 conforme la concentración de aluminio era mayor, comparando con la misma línea, pero en su estado natural (sin estrés). Lo mismo sucedió bajo las concentraciones de Cadmio, encontrando mayor metilación del ADN en la concentración alta de la sal. El aumento en la metilación de las plantas de la línea 1 bajo los tratamientos confirma el silenciamiento de genes como posible mecanismo de respuesta al estrés. Greco et al. (2011) reportaron en un estudio en el cual evaluaron DNA metiltransferasas específicas que la hipermetilación es un mecanismo de defensa en respuesta a toxicidad por cadmio en diversas plantas.

Sin embargo, este mismo patrón no se repitió para la línea transgénica L8, cuyo DNA se mostró más metilado en su estado natural (sin estrés) que bajo el estrés por Cd y Al, excepto para la concentración 100 μ M de Cd (Tabla 2). Un estudio realizado con plantas de tabaco confirmó que el nivel de metilación del ADN varía en gran medida (hiper o hipometilación) dependiendo de los estímulos externos y que esto está estrechamente relacionado con la activación de los genes de respuesta a estrés (Wada et al., 2004). Este mismo estudio confirmó una relación directa entre la expresión de genes de respuesta a estrés con la hipometilación del ADN genómico en plantas de tabaco. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la alta tolerancia que mostraron tener las plantas transgénicas de la línea 8 ante los tratamientos aplicados, podría deberse a la expresión diferenciada de genes involucrados con la resistencia debido a la disminución en la metilación del ADN de las plantas. Esto debido a que la disminución de la metilación implica expresión de genes. Para terminar de confirmar este hecho sería de gran importancia encontrar específicamente que genes fueron aquellos que se expresaron diferencialmente. Para lo cual se guardó tejido de las plantas y posiblemente se realicen estos estudios.

Cabe mencionar que en medio libre de sal, la línea transgénica L8 presentó un mayor porcentaje de metilación que la línea control, lo cual era de esperarse porque en su estado natural estas plantas presentan producción continua de peróxido de hidrógeno y por lo tanto

mayor inducción y represión de genes relacionados con el mecanismo de defensa de las plantas.

Sería muy útil para nosotros conocer los parámetros específicos de *N. tabacum* que indican hiper o hipo metilación, como se han establecido para otras especies. Sin embargo, todavía hay muy poca información sobre este tema.

Tabla 2. Porcentaje de metilación (%5-met) de la línea 1 y la línea 8 al día 16 después de la siembra en medio con diferentes concentraciones de Al y Cd.

	Control	Al 100 μM	Al 300 μM	Cd 100 μM	Cd 500 μM
L1	3.438	5.548	6.639	3.446	4.732
L8	5.973	4.114	4.167	9.371	5.297

Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Determinación de la respuesta diferencial fenotípica en etapa de plántula.

Los resultados mostraron que, en las etapas fenológicas evaluadas (desarrollo vegetativo y floración) y bajo los tratamientos aplicados, la línea transgénica (L8) y la línea control o acigoto (L1) sufrieron inhibición en su crecimiento comparando con el crecimiento de las plantas con riego normal, es decir sin adición de sales metálicas. Sin embargo, entre ambas líneas, no se encontró una respuesta diferencial significativa para ninguna de las tres variables de respuesta fenotípicas evaluadas: altura de la planta, diámetro de tallo y contenido de clorofila, al ser expuestas a las sales metálicas NaCl, AlCl₃ y CdCl₂ durante un periodo de 31 días (Figura 9). En todo caso el tratamiento que mostró mayor diferencia, aunque no significativa, entre las líneas 1 y 8 fue con la sal NaCl a una concentración de 600 mM (Figura 9b). Bajo este tratamiento se observó que las primeras plantas de la línea transgénica que comenzaron el periodo de floración, o antesis, lo hicieron 2 días antes que aquellas de la línea control. Y durante todo el proceso de floración éstas desarrollaron mayor cantidad de flores que las plantas de la línea 1 (Figura 10). De igual manera las plantas de la línea transgénica bajo el tratamiento con la concentración de 500 μM de la sal de cloruro de cadmio presentaron la etapa de antesis 3 días antes, así como mayor desarrollo de flores, comparando con las plantas de la línea 1 (Figura 11). Bajo los demás tratamientos no se encontraron diferencias con respecto al periodo de antesis y la cantidad de flores entre las plantas de ambas líneas.

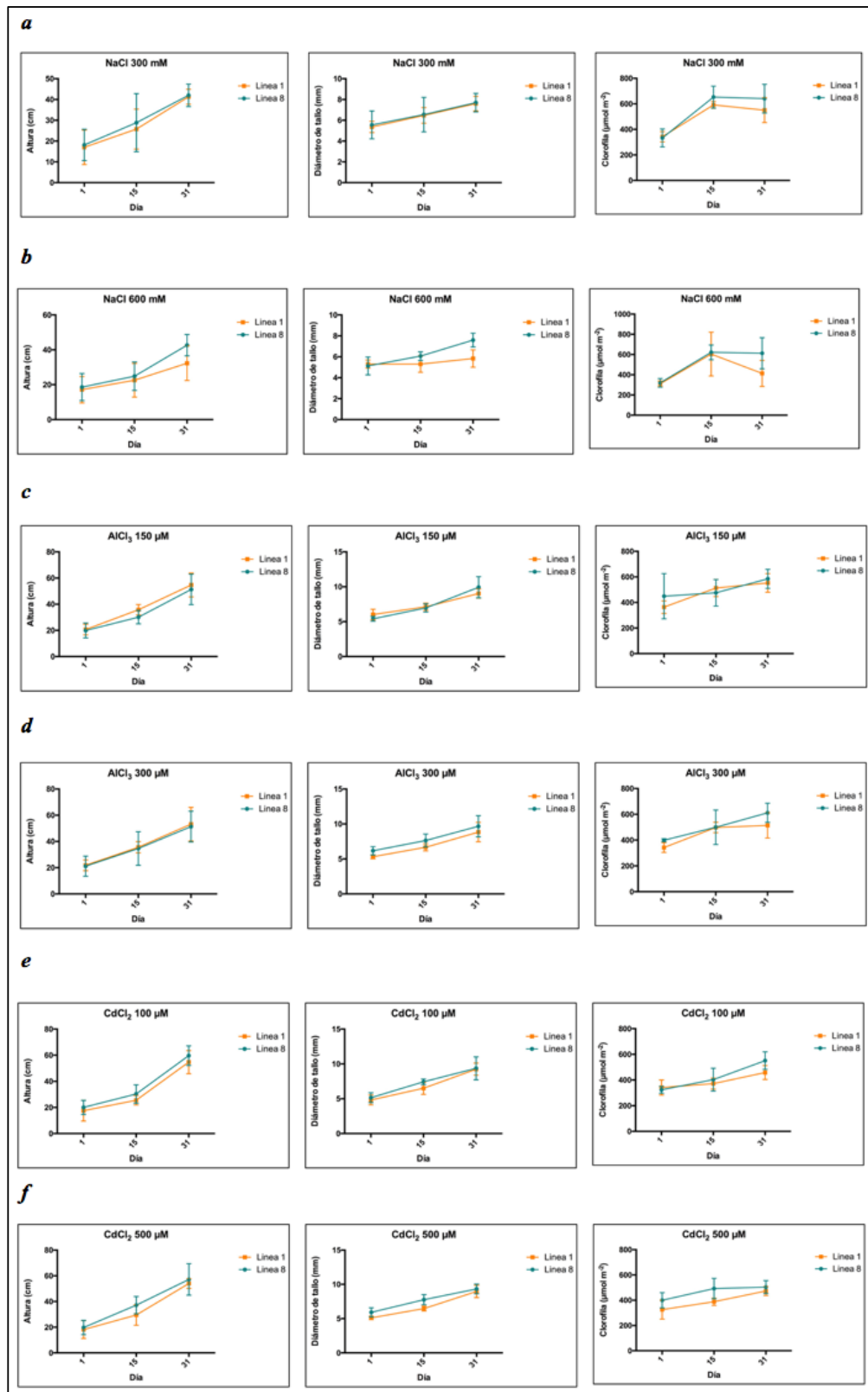


Figura 9. Altura (en cm), diámetro de tallo (en mm) y contenido de clorofila en hoja joven (en $\mu\text{mol m}^{-2}$) de la línea 1 y de la línea 8 de *N. tabacum* cv. xanthi nc durante el periodo experimental de 31 días en etapa de plántula bajo el tratamiento de riego adicionando diferentes concentraciones de NaCl (a y b), AlCl₃ (c y d) y CdCl₂ (e y f). Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Se determinó el peso fresco y seco de la parte aérea de las plantas al finalizar el experimento. Se obtuvo el promedio del peso seco específicamente para determinar la biomasa vegetativa de las plantas bajo los diferentes tratamientos. Se encontró que el promedio de la biomasa vegetativa de las plantas transgénicas fue mayor comparando con las plantas de la línea acigoto, excepto bajo los tratamientos con cloruro de aluminio. Estadísticamente esta diferencia fue significativa bajo las dos concentraciones (100 y 500 μM) de cloruro de cadmio (Tabla 3).

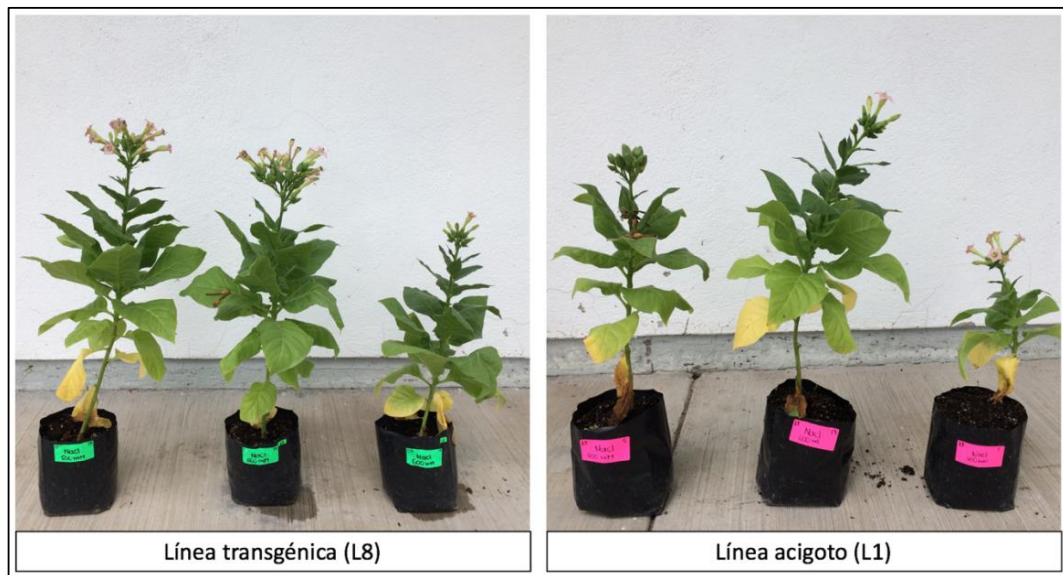


Figura 10. Efecto de la concentración 600 mM de cloruro de sodio sobre el periodo de floración de las plantas de *N. tabacum* cv. *xanthi nc* de las líneas 1 y 8 al día 31.

Estos resultados permiten inferir que la tolerancia ante el estrés que mostraron tener las plantas, con respecto al crecimiento (altura, diámetro y fotosíntesis), no se asocia a la presencia del transgen *CchGLP* sino que se deriva del mecanismo de defensa propio de la planta. Sin embargo, si tuvo un efecto significativo sobre la etapa de reproducción de las plantas que se sometieron a los tratamientos de NaCl (600 mM) y CdCl₂ (500 μM). Ambas concentraciones de las sales corresponden a la concentración alta utilizada, lo cual tiene sentido ya que a mayor concentración se esperan mayores signos de estrés. El efecto de la inserción del gen sobre el desarrollo de las plantas bajo la sal de cloruro de cadmio se confirmó al evaluar la biomasa vegetativa, que podría deberse a la mayor cantidad de botones florales y al tamaño de las hojas, más que por la altura o el diámetro basal del tallo. Las raíces se observaron al término del experimento (31 días). Se observaron raíces más abundantes y

vigorosas en las líneas transgénicas bajo los tratamientos de CdCl₂ 500 μM y NaCl 600 mM (Figura 12).

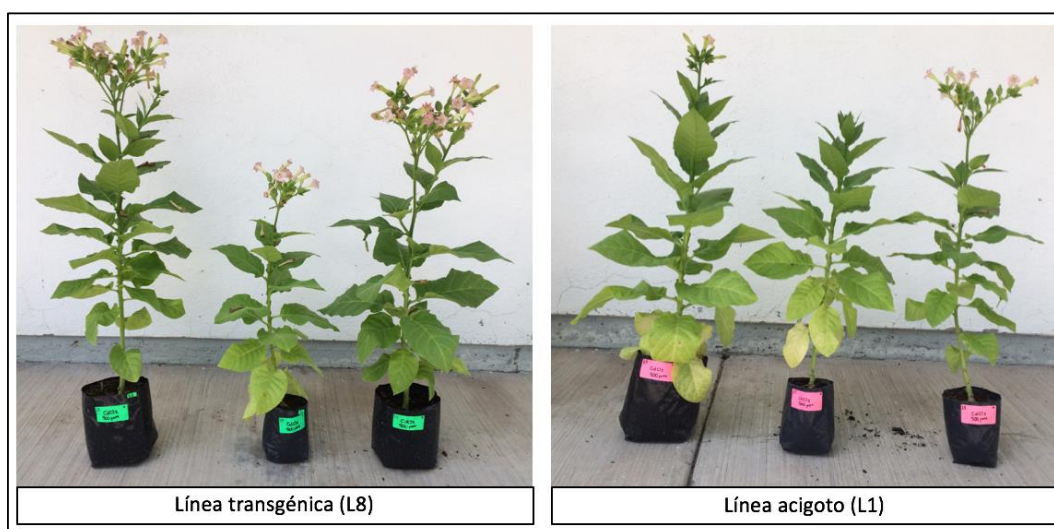


Figura 11. Efecto de la concentración 500 μM de cloruro de cadmio sobre el periodo de floración de las plantas de *N. tabacum* cv, xanthi nc de las líneas 1 y 8 al día 31.

Posteriormente se determinaron el peso fresco y peso seco radicular, con el objetivo de confirmar la biomasa radicular bajo cada uno de los tratamientos para ambas líneas. Los resultados del promedio de peso seco de las raíces confirmaron una diferencia significativa de la biomasa radicular bajo el tratamiento de CdCl₂ 500 μM, siendo esta mayor en las plantas de la línea transgénica (Tabla 4).

Tabla 3. Promedio del peso seco de la parte aérea de la línea 1 y la línea 8 bajo los diferentes tratamientos con sales metálicas.

Tratamiento	Línea 8 PSA (g)	Línea 1 PSA (g)
Control	36.33	30.33
NaCl 300 mM	18.36	16.71
NaCl 600 mM	13.67	6.29
AlCl ₃ 150 μM	26.37	28.18
AlCl ₃ 300 μM	28.04	28.08
CdCl ₂ 100 μM	30.33 ****	10.38 ****
CdCl ₂ 500 μM	29.67*	16.23*

PSA= peso seco de parte aérea. Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ y altamente significativos (**) cuando $P \leq 0.01$ y (***) $P \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

A pesar de que no hubo diferencias significativas bajo los demás tratamientos, los resultados de la biomasa radicular presentaron un patrón similar que los resultados de la biomasa vegetativa. Es decir que el promedio de la biomasa radicular de la línea transgénica fue mayor bajo todos los tratamientos, excepto bajo los tratamientos con AlCl_3 .

Tabla 4. Promedio del peso seco de raíz de la línea 1 y la línea 8 bajo los diferentes tratamientos con sales metálicas.

Tratamiento	Línea 8 PSR (g)	Línea 1 PSR (g)
Control	15.68	17.71
NaCl 300 mM	5.44	3.85
NaCl 600 mM	2.42	0.95
AlCl_3 150 μM	6.31	7.24
AlCl_3 300 μM	7.85	7.92
CdCl_2 100 μM	4.10	3.80
CdCl_2 500 μM	6.12*	3.53*

PSR=peso seco de raíz. Los resultados se consideraron significativos (*) cuando $P \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

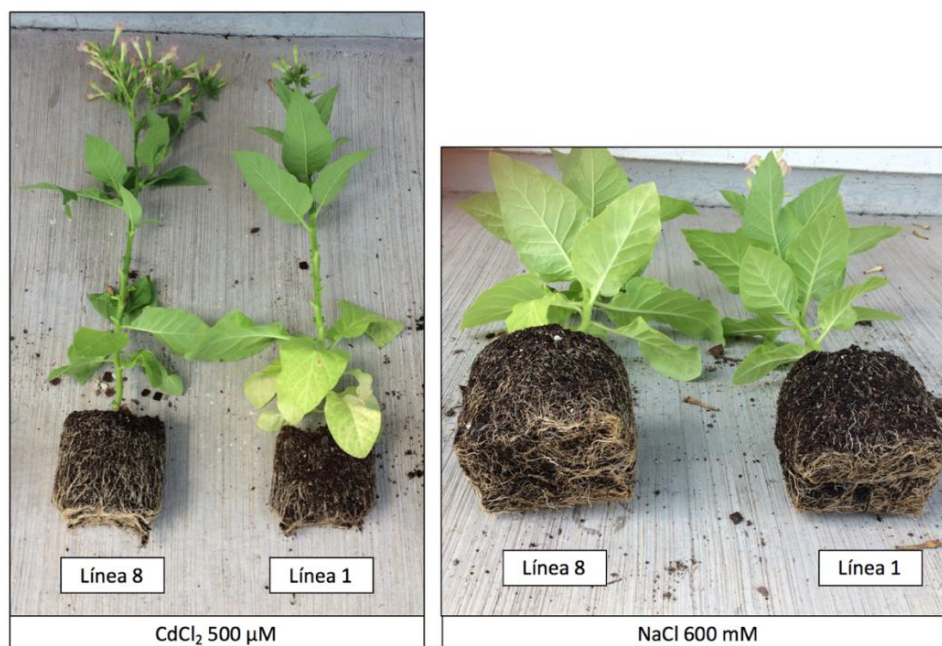


Figura 12. Efecto de la concentración 600 mM de cloruro de sodio sobre el periodo de floración de las plantas de *N. tabacum* cv, xanthi nc de las líneas control (L1) y transgénica (L8) al día 31.

Estos resultados permiten sugerir que el gen *CchGLP* influye sobre el vigor y la biomasa radicular de las plantas transgénicas, como respuesta al estrés causado por CdCl_2 a una concentración de 500 μM .

Resumen de resultados

Consideramos que las plantas transgénicas que expresan altamente el gen *CchGP* utilizadas en este estudio están naturalmente bajo un estado de estrés debido al hecho de que están produciendo constantemente peróxido de hidrógeno debido a la expresión del transgén. Durante este experimento expusimos a estas plantas a un estrés adicional, específicamente toxicidad por metales pesados y salinidad durante distintas etapas fenológicas. Se confirmó que las plantas transgénicas altamente expresivas están más preparadas para tolerar dicho estrés, comparando con su control acigoto en etapa de germinación. En dicha etapa, de acuerdo con los resultados se podría concluir que el cadmio tiene un efecto adverso sobre la línea control o acigoto, mientras que las plantas transgénicas son más resistentes. El estrés por aluminio resultó ser mucho menos agresivo y bajo las concentraciones utilizadas en este experimento, ninguna de las líneas mostró un deterioro total en el desarrollo vegetativo, sin embargo, las raíces de la línea acigoto mostraron mucho más daño que las de la línea 8. Con estos resultados podemos confirmar lo que se ha reportado frecuentemente en la literatura, que es que el estrés por aluminio, bajo ciertas concentraciones, afecta principalmente a las raíces de las plantas y el estrés por cadmio afecta tanto al desarrollo vegetativo como el desarrollo radicular.

Nuestro objetivo con la medición del porcentaje de metilación del ADN fue determinar en qué medida este mecanismo molecular es clave en la tolerancia que muestran las plantas transgénicas bajo condiciones de estrés por metales pesados en etapa de germinación. La metilación del ADN en la línea 8, que fue la que mostró mayor resistencia, fue menor bajo los tratamientos aplicados. Es decir que lo más probable es que hubo expresión diferenciada de genes relacionados al mecanismo de defensa.

Por otro lado, en etapa de plántula el efecto de la inserción del gen no fue tan evidente como el que se presentó en etapa de germinación. Esto podría ser debido a que en etapa de plántula el mecanismo de defensa de las plantas ha madurado y pueden tolerar en mayor medida las condiciones adversas. Con respecto a las variables de respuesta: altura, diámetro de tallo y cantidad de clorofila en hoja, ambas líneas mostraron una tolerancia muy similar. Esta tolerancia por lo tanto se puede adjudicar a los mecanismos de defensa propios de la planta y

no a la inserción del gen.

Así como en etapa de germinación, el cloruro de aluminio fue la sal metálica menos agresiva para las plantas y el cloruro de cadmio fue la más perjudicial. Pero fue precisamente bajo el tratamiento de cloruro de cadmio 500 μM en donde se hizo evidente que la expresión del gen en las plantas transgénicas de la línea L8 se relacionó con menores efectos de estrés durante la antesis y etapa de reproducción. Así como mayor biomasa vegetativa y radical al finalizar el periodo experimental.

Los resultados proporcionan nuevas perspectivas que pueden conducir a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares en respuesta a estrés por sales metálicas en plantas transgénicas al transgén *CchGLP*. El estudio de los patrones de metilación del ADN y la expresión de genes nos llevan a comprender más acerca de la inmunidad de las plantas. Además, estos avances proporcionarán claves para mejorar la tolerancia de los cultivos a través de la biotecnología, desde un aspecto molecular. La línea 8 se distingue como la más resistente por lo que es un cultivo a estudiar.

8. CONCLUSIÓN

La expresión del gen *CchGLP* de chile habanero en tabaco (*Nicotiana tabacum* spp) confiere tolerancia a condiciones de toxicidad por metales pesados durante la etapa de germinación debido a la inducción de genes de respuesta a este estrés comparando con el control acigoto de la misma. En etapa de plántula, el gen *CchGLP* no mostró tener una relación directa con la respuesta fenotípica y por lo tanto con la tolerancia de las plantas en condiciones de estrés por salinidad y estrés por sales de aluminio. La inserción y alta expresión del gen *CchGLP* le confirió a las plantas tolerancia a condiciones de toxicidad por cadmio durante la etapa de plántula.

9. REFERENCIAS

- Alloway, B.J., 2013. Introduction, in: Alloway, B.J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and Their Bioavailability*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3–9. doi:10.1007/978-94-007-4470-7_1
- Andresen, E., Hendrik, K., 2013. Cadmium toxicity in plants, in: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds.), *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. Springer, pp. 395–413. doi:10.1007/978-94-007-5179-8
- Bajaj, S., Mohanty, A., 2005. Recent advances in rice biotechnology — towards genetically superior transgenic rice 275–307. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00130.x
- Barrera-Pacheco, A., Joaquín-Ramos, A.D.J., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Pérez-Pérez, M.C.L., Guevara-Olvera, L., Guevara-González, R.G., 2008. Análisis de la expresión transcripcional inducida Bajo condiciones de estrés biótico y abiótico en *Capsicum chinense* BG-3821. *Agrociencia* 42, 95–106.
- Basit, A., Hemlata, W., Abdul, C., Wani, H., Singh, S., Upadhyay, N., 2016. Salicylic acid to decrease plant stress. *Environ. Chem. Lett.* doi:10.1007/s10311-016-0584-0
- Birch, R.G., 1997. PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 297–326. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.297
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A., Masmoudi, K., 2007. Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNHX1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants 58, 301–308. doi:10.1093/jxb/erl251
- Cardenas-Manríquez, G., Vega-Muñoz, I., Villagómez-Aranda, A.L., León-Galvan, M.F., Cruz-Hernandez, A., Torres-Pacheco, I., Rangel-Cano, R., Rivera-Bustamante, R.F., Guevara-Gonzalez, R., 2016. Proteomic and metabolomic profiles in transgenic tobacco (*N. tabacum xanthi nc*) to CchGLP from *Capsicum chinense* BG-3821 resistant to biotic and abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* 130, 33–41gggçñikui. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.05.005
- Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Schenk, P.M., 2014. Plant defence inducers rapidly influence the diversity of bacterial communities in a potting mix. *Elsevier B.V.* 84, 1–5. doi:10.1016/j.apsoil.2014.06.011
- Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Misra, P., Tiwari, M., Shri, M., Shukla, D., Kumar, S., Rai, A., Pandey, A., Nigam, D., Tripathi, R.D., Tuli, R., 2009. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere* 74, 688–702. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.082
- Ciamporova, M., 2002. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. *Biol. Plant.* 45, 161–171.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H., 2002. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* Copper and Zinc Phytotoxicity : a comparison. *Plant Physiol* 876.
- Davidson, R.M., Reeves, P.A., Manosalva, P.M., Leach, J.E., 2009. Germins: A diverse protein family important for crop improvement. *Plant Sci.* 177, 499–510. doi:10.1016/j.plantsci.2009.08.012
- Delhaize, E., Ryan, P.R., 1995. Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiol* 107, 315–321. doi:10.1072/315 [pii]
- Dubey, S., Shri, M., Misra, P., Lakhwani, D., Rice, M., 2014. Heavy metals induce oxidative stress and genome-wide modulation in transcriptome of rice root. doi:10.1007/s10142-014-0361-8

- Dunwell, J.M., Gibbings, J.G., Mahmood, T., Saqlan Naqvi, S.M., 2008. Germin and germin-like proteins: evolution, structure and function. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 27, 342–375. doi:10.1080/07352680802333938
- Dunwell, J.M., Khuri, S., Gane, P.J., 2000. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 153–179. doi:10.1128/MMBR.64.1.153-179.2000
- Feng, S., Jacobsen, S.E., 2011. Epigenetic modifications in plants: An evolutionary perspective. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 179–186. doi:10.1016/j.pbi.2010.12.002
- Foresight, 2011. The Future of Food and Farming : Challenges and choices for global sustainability The Future of Food and Farming : Challenges and choices for.
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K., Ma, J.F., 2007. An Aluminum-Activated Citrate Transporter in Barley 48, 1081–1091. doi:10.1093/pcp/pcm091
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2011. Cadmium stress tolerance in crop plants Probing the role of sulfur 215–222. doi:10.4161/psb.6.2.14880
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.G., Toyota, M., Devireddy, A.R., Mittler, R., 2014. A tidal wave of signals: Calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* 19, 623–630. doi:10.1016/j.tplants.2014.06.013
- Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., Bitonti, M.B., 2012. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J. Exp. Bot.* 63, 695–709. doi:10.1093/jxb/err313
- Guevara-Olvera, L., Ruíz-Nito, M.L., Rangel-Cano, R.M., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R.F., Muñoz-Sánchez, C.I., González-Chavira, M.M., Cruz-Hernandez, A., Guevara-González, R.G., 2012. Expression of a germin-like protein gene (*CchGLP*) from a geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 78, 45–50. doi:10.1016/j.pmpp.2012.01.005
- Guo, T., Sun, L., Han, L., Qiu, M., 2014. Aluminum and Cadmium Forms in Stressed Rhizosphere Soil and Their Bioavailability to Two *Hordeum vulgare* L. Varieties 42, 494–497. doi:10.1002/clen.201300091
- Gutiérrez, D.F., Ruiz, R., Xoconostle, B., 2015. Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional, primera ed. ed. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- He, X.-J., Chen, T., Zhu, J.-K., 2011. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.* 21, 442–465. doi:10.1038/cr.2011.23
- Himeno, S., Yanagiya, T., Fujishiro, H., 2009. The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochimie* 91, 1218–1222. doi:10.1016/j.biochi.2009.04.002
- Huang, D., Gong, X., Liu, Y., Zeng, G., 2017. Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. *Planta.* doi:10.1007/s00425-017-2664-1
- Iannone, M.F., Rosales, E.P., Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2010. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium 15–27. doi:10.1007/s00709-009-0097-9
- Jovelina, C., Pacheco, E., Modolo, L., 2017. Salinity-induced accumulation of endogenous H₂S and NO is associated with modulation of the antioxidant and redox defense systems in *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana. *Plant Sci.* 256, 148–159. doi:10.1016/j.plantsci.2016.12.011
- Kim, D., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., Lee, Y., Nutrition, P., 2007. The ABC

- transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance 3, 207–218. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03044.x
- Kochian, L. V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., 2004. How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 459–493. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655
- Kochian, L. V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A., 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274, 175–195. doi:10.1007/s11104-004-1158-7
- Kumar, K., Kumar, M., Kim, S.-R., Ryu, H., Cho, Y.-G., 2013. Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice* 6, 27. doi:10.1186/1939-8433-6-27
- Küpper, H., Kochian, L. V., 2010. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). *New Phytol.* 114–129.
- Law, J.A., Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11, 204–220. doi:10.1038/nrg2719
- Liu, J., Magalhaes, J. V., Shaff, J., Kochian, L. V., Maize, E., Lagoas, S., Grosso, M., 2009. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance 389–399. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03696.x
- Magalhaes, J. V., Liu, J., Guimaraes, C.T., Lana, U., Shaff, J.E., Klein, P.E., Wang, Y., Schaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Pin, M.A., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N., Kochian, L. V., 2007. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum 39, 1156–1161. doi:10.1038/ng2074
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 139–158. doi:10.1016/j.abb.2005.10.018
- Matsumoto, H., 2000. Cell Biology of Aluminum Toxicity and Tolerance in Higher Plants 200, 1–46.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Negrão, S., Schmöckel, S.M., Tester, M., 2016. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot. mcw191*. doi:10.1093/aob/mcw191
- Ouyang, S., Liu, Y., Liu, P., Lei, G., He, S., Ma, B., Zhang, W., Zhang, J., 2010. Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants 21, 316–329. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04146.x
- Pereira, J.F., Zhou, G., Delhaize, E., Richardson, T., Zhou, M., Ryan, P.R., 2010. Engineering greater aluminium resistance in wheat by over-expressing 205–214. doi:10.1093/aob/mcq058
- Perfus-barbeoch, L., Leonhardt, N., Ñ, A.V., Forestier, C., Cadarache, C.E.A., Membranaires, E., Cea-cnrs, U.M.R., 2002. Heavy metal toxicity : cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status 539–548.
- Roy, S.J., Negrão, S., Tester, M., 2014. Salt resistant crop plants ´. *Curr. Opin. Biotechnol.* 115–124. doi:10.1016/j.copbio.2013.12.004
- Ruiz Nito, M., 2009. EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE CchGLP (Capsicum chinense GLP) en *Nicotiana Tabacum Xanthi nc* PARA EVALUAR RESISTENCIA A GEMINIVIRUS.
- Ryan, P.R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W.J., Delhaize, E., 2009. A Second Mechanism for Aluminum Resistance in Wheat Relies on the Constitutive Efflux of Citrate from Roots 1 [W][OA] 149, 340–351. doi:10.1104/pp.108.129155
- Saidi, I., Ayouni, M., Dhieb, A., Chtourou, Y., Chaïbi, W., Djebali, W., 2013. Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants : Protective role of

- salicylic acid. *South African J. Bot.* 85, 32–38. doi:10.1016/j.sajb.2012.12.002
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants 52, 2115–2126.
- Scheben, A., Edwards, D., 2017. Genome editors take on crops. *Science* (80-.). 355, 1122–1123. doi:10.1126/science.aal4680
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Ā, R.T., 2009. Ecotoxicology and Environmental Safety Effect of arsenic on growth , oxidative stress , and antioxidant system in rice seedlings \$ 72, 1102–1110. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.09.022
- Shukla, D., Kesari, R., Mishra, S., 2012. Expression of phytochelatin synthase from aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L . enhances cadmium and arsenic accumulation in tobacco 1687–1699. doi:10.1007/s00299-012-1283-3
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., SINGH, V.P., Prasad, S.M., 2015. Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics and ionomics. *Front. Plant Sci.* 6, 1–36. doi:10.3389/fpls.2015.01143
- Song, X., Huang, F., Liu, J., Li, C., Gao, S., Wu, W., Zhai, M., Yu, X., Xiong, W., Xie, J., Li, B., 2017. Genome-wide DNA methylomes from discrete developmental stages reveal the predominance of non-CpG methylation in *Tribolium castaneum*. *DNA Res.* 24, 445–458. doi:10.1093/dnares/dsx016
- Srekanth, P.C.N.K.D.L.T.V.M., 2010. Heavy metals , occurrence and toxicity for plants : a review 199–216. doi:10.1007/s10311-010-0297-8
- Sun, Q., Hong, Z., Rong, X., Hung, M., 2007. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* 164. doi:10.1016/j.jpplph.2006.10.001
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2014. Heavy Metals Toxicity and the Environment 1–30. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4
- Veluthakkal, R., Dasgupta, M.G., 2015. Agrobacterium-mediated transformation of chitinase gene from the actinorhizal tree *Casuarina equisetifolia* in *Nicotiana tabacum*. *Biologia (Bratisl)*. 70. doi:10.1515/biolog-2015-0114
- Vij, S., Tyagi, A.K., 2007. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol. J.* 5, 361–380. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00239.x
- Wada, Y., Miyamoto, K., Kusano, T., Sano, H., 2004. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. *Mol. Genet. Genomics* 271, 658–666. doi:10.1007/s00438-004-1018-4
- Wang, X., Liu, Y., Zeng, G., Chai, L., Song, X., Min, Z., Xiao, X., 2008. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in 62, 389–395. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.10.014
- Yue, R., Lu, C., Qi, J., Han, X., Yan, S., Guo, S., Liu, L., Fu, X., Chen, N., Yin, H., Chi, H., Tie, S., 2016. Transcriptome Analysis of Cadmium-Treated Roots in Maize (*Zea mays* L.). *Front. Plant Sci.* 7, 1–11. doi:10.3389/fpls.2016.01298
- Zhao, X.Q., Chen, R.F., Shen, R.F., 2014. Coadaptation of Plants to Multiple Stresses in Acidic Soils. *Soil Sci.* 179, 503–513. doi:10.1097/SS.0000000000000086
- Zheng, S.J., 2010. Crop production on acidic soils : overcoming aluminium toxicity and phosphorus deficiency 183–184. doi:10.1093/aob/mcq134