



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

Departamento de Biotecnología y Bioquímica

**“ANÁLISIS DE GENES DE FUNCIÓN DESCONOCIDA DE
AMARANTO DE GRANO QUE SE EXPRESAN EN
MÚLTIPLES CONDICIONES DE ESTRÉS”**

Tesis que presenta:

IBQ. GABRIELA CABRALES ORONA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

con especialidad en Biotecnología de Plantas

Director de Tesis

DR. JOHN PAUL DÉLANO FRIER

Irapuato, Gto.

Agosto 2017

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas bajo la asesoría del Dr. John Paul Délano Frier, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, perteneciente al CINESTAV-IPN, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría (Beca número 707403)

Al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato**, por facilitar los recursos necesarios para la realización de este proyecto.

Al **Dr. John Paul Délano Frier** por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por demostrarme que la dedicación y perseverancia forman parte del camino para obtener nuevos conocimientos. Gracias por despertar en mí el interés en la ciencia.

A la **Dra. Nayelli Marsh Martínez** y al **Dr. Rubén Rellán Álvarez**, quiero agradecerles por sus observaciones en las reuniones tutoriales que fueron de vital importancia para este proyecto.

A la **QFB. Norma Angélica Martínez Gallardo** le agradezco infinitamente por su paciencia y asesoría brindada en la técnica de tiempo real.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas: **Kena, Paula Ismael, Tzitziki, Andrea, Claudia, Cecy, Alessandro y Jonathan** por su imprescindible ayuda, consejos y sobre todo por su grata compañía.

A mis amigos y amigas, **Héctor Guillén, Valentín Luna, Antolin Peralta, Judith Zarate, Alejandra Castañeda, Ury Díaz, Gilberto Álvarez, Ahiko Lara, Diego Rodríguez**, gracias por los momentos compartidos, en esta nueva etapa de nuestras vidas.

A **Brenda Rodríguez**, mi primer estudiante de verano científico, gracias por tu ayuda en los experimentos y por tu amistad.

A **Noé Baruch**, gracias por tus consejos, tiempo y amistad.

A mi novio **Elihú Méndez**, gracias por formar parte de mi vida, realmente eres muy especial para mí.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por haberme dado fuerzas para seguir siempre adelante y salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres Sofía y Juan Manuel

Que son todo para mí, gracias por apoyarme siempre, por sus consejos, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su gran amor.

A mis hermanos Edgar Hiram y Johanna Sofía

Por ser quienes son, mis hermanos pequeños, gracias por compartir conmigo el mismo tesoro de recuerdos y experiencias que hemos pasado, los amo con todo mi corazón

A mi gran familia

Por todo el apoyo y cariño que me han dado a lo largo de mi vida, porque siempre han estado pendientes de mí, listos para tenderme la mano, los quiero mucho.

Contenido

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Estrés abiótico.....	5
2.2 Estrés biótico por insectos herbívoros, patógenos y daño mecánico.....	7
2.3 Modelo de estudio: El amaranto.....	11
2.3.1 Generalidades.....	11
2.3.2 Importancia nutricional.....	12
2.3.3 Respuestas del amaranto a condiciones de estrés.....	13
2.4 Proteínas de función desconocida.....	14
2.4.1 Familia DUF642.....	16
2.5 Factores de transcripción.....	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo General.....	18
4.1.1 Objetivos específicos.....	18
V. METODOLOGÍA.....	19
5.2 Material biológico.....	19
5.2 Condiciones de estrés en amaranto.....	19
5.2.1 Experimento de alta salinidad.....	19
5.2.2 Experimento de herbivoría.....	20
5.2.3 Experimento de defoliación.....	20
5.2.4 Experimento de sequía.....	21
5.2.5 Experimento de infección bacteriana con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss) y <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i> (Cmm).....	22
5.3 Escrutinio de genes de función desconocida.....	23
5.4 Diseño de oligonucleótidos.....	23
5.5 Extracción de ARN total.....	23
5.7 Síntesis de ADN complementario y análisis de expresión mediante qRT-PCR.....	24
5.8 Generación de la construcción p35S::Ah-2880-GUS.....	25
5.9 Generación de la construcción pAh-Hfr::GUS-GFP.....	25
VI. RESULTADOS.....	26
6.1 Secuencias transcriptómicas de interés.....	26
6.2 Cambios en la expresión de los genes de interés en estrés biótico y abiótico.....	27

6.3 Cambios en la expresión de los genes de función desconocida en estrés biótico	28
6.3.1 Herbivoría	28
6.3.2 Infección bacteriana virulenta	33
6.3.3 Infección bacteriana avirulenta	37
6.3.4. Defoliación mecánica	46
6.4 Cambios en la expresión de los genes de función desconocida en estrés abiótico.....	48
VII. DISCUSIÓN	58
7.1 Gen HFR.....	59
7.2 Gen DGR	61
7.3 Gen DUF3407	62
7.4 Gen ERD7	63
7.5 Gen Zn Finger	63
7.6 Genes 2880, 3240 y 3844.....	64
VIII. CONCLUSIONES.....	65
IX. PERSPECTIVAS	66
X. BIBLIOGRAFÍA.....	67
XI. ANEXOS	73
XI. APÉNDICES	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría.

Figura 2. Expresión relativa del gen *DGR* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría.

Figura 3. Expresión relativa del gen *3844* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría.

Figura 4. Expresión relativa del gen *3240* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría.

Figura 5. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana virulenta por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*).

Figura 6. Expresión relativa del gen *2880* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana virulenta por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*).

Figura 7. Expresión relativa del gen *3240* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana virulenta por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*).

Figura 8. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*).

Figura 9. Expresión relativa del gen *2880* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*).

Figura 10. Expresión relativa del gen *ERD7* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*).

Figura 11. Expresión relativa del gen *DUF3407* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*).

Figura 12. Expresión relativa del gen *DGR* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*).

Figura 13. Expresión relativa del gen *3844* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*).

Figura 14. Expresión relativa del gen *3240* en hoja local, hoja sistémica, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*).

Figura 15. Expresión relativa del gen *DGR* en hoja de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación severa.

Figura 16. Expresión relativa del gen *ZnFinger* en hoja de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación severa.

Figura 17. Expresión relativa del gen *DUF3407* en hoja de plantas de *A. cruentus* en sometidas a defoliación severa.

Figura 18. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja de plantas de *A. cruentus* en sometidas a defoliación severa.

Figura 19. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

Figura 20. Expresión relativa del gen *ERD7* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

Figura 21. Expresión relativa del gen *Zn Finger* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

Figura 22. Expresión relativa del gen *DGR* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

Figura 23. Expresión relativa del gen *DUF3407* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

Figura 24. Expresión relativa del gen *3240* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

Figura 25. Expresión relativa del gen *3844* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

Figura 26. Expresión relativa del gen *2880* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, en respuesta a alta salinidad.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
ABA	Ácido abscísico
FT	Factores de transcripción
RH	Respuesta hipersensible
AS	Ácido salicílico
AJ	Ácido jasmónico
ET	Etileno
IP	Inhibidores de proteasas
PAL	Fenilalanina amonio liasa
M	Metros
D	Días
PUF	Proteínas de función desconocida
DUF	Dominios de función desconocida
dS	Decisiemens.
mM	Milimolar
mL	Mililitros
CE	Conductividad eléctrica
g/L	Gramos por litro
Sdg	Semanas despues de la germinación
uL	Microlitros
M	Molaridad
Mg	Miligramos
ARN	Ácido ribonucleico
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Pb	Pares de bases
°C	Grados centígrados
Pi	Post infección
<i>Ah</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
Ddt	Días después del tratamiento

RESUMEN

La variabilidad de las condiciones ambientales frecuentemente tiene un efecto adverso sobre el crecimiento óptimo de las plantas. Específicamente, la sequía, herbivoría, salinidad y las altas o bajas temperaturas, pueden disminuir drásticamente el desarrollo y productividad de los cultivos. La tolerancia o sensibilidad a las diferentes condiciones de estrés depende de la especie, genotipo y estadio de desarrollo de la planta. Estas diferencias entre las plantas se deben a la eficiencia de sus mecanismos particulares de respuesta al estrés. El amaranto de grano (i. e., *Amaranthus hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*), un cultivo importante para el alimento de las civilizaciones prehispánicas, cayó en el olvido debido a fenómenos políticos y culturales. Sin embargo, ha recuperado interés hoy en día debido a sus excepcionales propiedades nutricionales y agronómicas. Asimismo, las semillas y hojas poseen varios compuestos nutraceuticos que pueden contribuir a prevenir, e incluso curar, varias enfermedades crónicas y otros padecimientos, como alergias. Desde el punto de vista agronómico, el amaranto es capaz de adaptarse a diferentes tipos de suelo y climas. A partir de lo anterior, ha surgido el interés por la caracterización de genes de función desconocida en plantas de amaranto de grano inducidos bajo diversas condiciones de estrés, incluyendo la infección bacteriana, sequía, salinidad y herbivoría por insectos. Para explorar el patrón de inducción de algunos de estos genes, dos bacterias con virulencia contrastante fueron utilizadas: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) (avirulenta) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (virulenta). Los tratamientos de estrés por defoliación completa se realizaron en etapas de desarrollo vegetativo (vegetativa 1 [planta joven] y 2 [planta en pleno desarrollo]), y reproductivo (emergencia de panoja y floración), mientras el estrés salino agudo fue monitoreado por 4, 7 y 9 días. Finalmente, larvas de *Trichoplusia ni*, un insecto masticador, fueron utilizadas para los ensayos de herbivoría, analizados después de 16 h de herbivoría continua. Hojas, tallos y raíces fueron colectadas en todos los experimentos para cuantificar los niveles de expresión de cada uno de los genes por qRT-PCR. El nivel de expresión de los genes varió dependiendo de la variedad, tratamiento, tejido y etapa de desarrollo. Con los genes candidatos de mayor interés, se pretende realizar una subsiguiente caracterización funcional mediante la sobreexpresión de éstos en *Arabidopsis thaliana*. De este estudio

surgieron dos genes candidatos (i. e., *Ah-2880* y *Ah-HFR*) para su subsiguiente caracterización funcional debido a que mostraron altos niveles de expresión en ciertas condiciones de estrés. En el gen *Ah-HFR* se observó que sus niveles incrementaron en la herbivoría, salinidad y defoliación. A su vez, los patrones de expresión en *Ah-2880* mostraron altos niveles de expresión en respuesta a alta salinidad y a la infección avirulenta con *Pss*. Los resultados derivados de este trabajo son coherentes con investigaciones previas. Sugieren, además, que estos genes podrían estar implicados en la tolerancia al estrés biótico y abiótico. Utilizando enfoques de genética clásica, nuestros objetivos futuros se centrarán en la caracterización funcional en plantas transgénicas de *A. thaliana*, la cual aportará información importante para el mejoramiento genético del amaranto de grano y/ o de otros cultivos agronómicos de importancia, como los cereales.

ABSTRACT

The variability of environmental conditions often has an adverse effect on optimal plant growth. Specifically, drought, herbivory, salinity, and high and low temperatures can drastically reduce plant growth and crop productivity. The tolerance or sensitivity to different stress conditions depends on the species, genotype, and/or plant developmental stage. Fitness differences between plants is known to depend on the efficiency of their particular stress response mechanisms. Grain amaranths (i. e., *Amaranthus hypochondriacus*, *A. cruentus* and *A. caudatus*), which used to be a major food crop for Pre-Hispanic civilizations, fell into oblivion because of political and cultural phenomena. However, it has regained interest nowadays due to their exceptional nutritional and agronomical properties. For example, the seeds and leaves possess several nutraceutical compounds that may help prevent, and even cure, several chronic diseases and other ailments. From the agricultural point of view, grain amaranths are able to adapt to different soil types and climates. This study aimed to identify and select genes of unknown function from different grain amaranth species expressed in response to several stress conditions, including bacterial infection, drought, salinity and herbivory. To explore the induction pattern of some of these genes, two bacteria with contrasting virulence were used: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) (avirulent response) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) (virulent response). Stress caused by severe defoliation treatments were performed during vegetative (i. e., vegetative 1 [young plants]

and 2 [developing plants]), and reproductive stages (panicle emergence and flowering). Salinity stress treatments were 4, 7 and 9 days. Finally, three chewing *Trichoplusia ni* larvae were used for the herbivory stress, analyzed 16 h after chewing herbivory. Leaves, stems and roots were collected in all assays to quantify expression levels of each gene by qRT-PCR. The expression levels varied depending on the species, treatment, tissue and stage of development. We chose two candidate genes for subsequent characterization, *Ah-2880* and *Ah-HFR*, due to their high expression levels in various stress conditions. Thus, the expression of the *Ah-HFR* gene, was observed to increase in response to herbivory, salinity, and defoliation. On the other hand, the expression patterns in *Ah-2880* showed it to be highly responsive to high salinity stress and to avirulent bacterial infection by *Pss*. The results obtained in this study were coherent with previous findings, suggesting a role for these genes in the tolerance to (a)biotic stress in grain amaranth. Future approaches based on classic genetics, will focus on the functional characterization of these genes in transgenic *A. thaliana* plants. This study offers novel insights regarding the potential for the genetic improvement of grain amaranth and other important agronomic crops, such as cereals.

I. INTRODUCCIÓN

Cada vez es más difícil satisfacer las demandas alimentarias de la creciente población humana, que se espera que llegue alrededor de nueve mil millones para el año 2050 (Stephenson *et al.*, 2010). Aunado a esto, los actuales modelos de predicción climática indican un aumento gradual de la temperatura del ambiente que repercutirá en las tierras cultivables en un futuro cercano (Ahuja *et al.*, 2010). Estos factores repercuten en el desarrollo y productividad de los cultivos. Sin embargo, algunas plantas son capaces de tolerar condiciones ambientales adversas, como es el caso del amaranto.

El amaranto es una planta dicotiledónea del tipo C₄ que pertenece a la familia Amaranthaceae y el género, *Amaranthus*, comprende alrededor de 70 especies, con una amplia variabilidad genética y distribución, tanto en zonas cálidas y templadas. Dichas especies son empleadas para la producción de grano, forraje, o pueden crecer como malezas agresivas (Espitia Rangel *et al.*, 2012). La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, lo ha considerado como un cultivo de alto valor nutricional en la dieta humana (Ulbricht *et al.*, 2009), porque la calidad de la semilla es mejor que todos los

cereales, ya que es rico en lisina y metionina. En otro estudio se ha observado que es fuente importante de minerales como sodio, potasio, fosforo, etc. Además de carbohidratos y fibra (Barba de la Rosa *et al.*, 2007)

Se ha encontrado que tiene características agronómicas deseables debido a que muestra tolerancia a diferentes condiciones de estrés, como sequía, salinidad, altas o bajas temperaturas. En un estudio transcriptómico se observó que una gran cantidad de genes respondió ante las diversas condiciones de estrés, ya que los niveles de expresión aumentaron significativamente en genes que aún no han sido caracterizados (Délano-Frier *et al.*, 2011).

Por esta razón el presente estudio se enfocó en el análisis de genes de función desconocida de amaranto de grano, que se indujeron en varias condiciones de estrés, normalmente asociadas a pérdidas severas en el rendimiento de los cultivos comerciales, como: sequía, alta salinidad, defoliación severa, herbivoría por insectos e infección bacteriana. Con ello se pretende identificar genes candidatos que confieran tolerancia o resistencia ante los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, con la finalidad de proponerlos para el mejoramiento genético del amaranto y de otros cultivos de interés agronómico.

II. ANTECEDENTES

2.1 Estrés abiótico

Debido a su estilo de vida sésil, las plantas están continuamente expuestas a una amplia gama de estrés ambiental (Nobuhiro *et al.*, 2014). Éste incluye el estrés biótico ocasionado por organismos vivos, desde patógenos (bacterias, hongos y virus, etc.), así como de herbívoros (desde insectos a rumiantes). Por otro lado, el estrés abiótico es causado por condiciones desfavorables en el ambiente como la sequía, salinidad, calor o frío extremos incluyendo congelación, alta intensidad luminosa, exposición a ozono (O₃) y tensiones anaeróbicas o anoxia, durante inundación del terreno, por ejemplo (Wang *et al.*, 2003; Chaves & Oliveira, 2004; Bailey & Voeselek, 2008). Estos factores de estrés limitan la productividad de los cultivos en todo el mundo (Mahajan *et al.*, 2005).

La tolerancia de las plantas se refiere a la capacidad para sobrevivir y reproducirse bajo estrés ambiental (Simms, 2001) mientras que la resistencia se refiere a rasgos que previenen el estrés o lo limitan (Boots & Bowers, 1999). Aunque existe una variabilidad en la tolerancia al estrés entre especies de plantas cultivadas, la mayoría son altamente sensibles cuando están expuestas a largos períodos de estrés. Por ello, el nivel y la duración del estrés tienen un efecto significativo sobre la intensidad y complejidad de la respuesta, involucrando un incremento en la respiración, alteraciones en el sistema de transporte de electrones, inhibición de fotosíntesis, reducción en biomasa y alteración del ciclo celular (Cramer *et al.*, 2011). Sin embargo, las plantas deben ser capaces de responder y adaptarse a los diferentes tipos de estrés, al menos hasta completar su ciclo de vida o alcanzar rendimientos aceptables, ya que es prácticamente imposible evitarlos. Las respuestas son controladas mediante adaptaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y, también, modificaciones a nivel molecular. Éstas involucran, por lo general, cambios en la expresión génica de numerosos genes que están relacionados, de algún modo, con la respuesta al estrés (Wang *et al.*, 2003; Bruce *et al.*, 2007; Datta *et al.*, 2012)

El estrés abiótico es la principal causa de pérdida de cultivos en todo el mundo, reduciendo más del 50% el rendimiento promedio de la mayoría de los cultivos (Bray *et al.*, 2000). Actualmente, existen problemas causados por la combinación entre sequía y salinidad que ocurren en muchas regiones, lo que podría ocasionar una grave salinización de más del 50% en las tierras cultivables para el año 2050 (Wang *et al.*, 2003; Ashraf, 2009). La sequía o el déficit de agua y la salinidad son dos factores ambientales críticos que afectan el crecimiento de las plantas y sus procesos fisiológicos y metabólicos, dando como resultado reducciones significativas en grandes áreas de tierra cultivable (Sakamoto *et al.*, 2008). La tolerancia de las plantas a estos dos factores forma parte de uno de los principales temas de investigación actuales, en parte porque las plantas pueden percibir el estrés y elucidar apropiadamente las respuestas, capacidad que tiene el potencial de optimizarse.

Existen circuitos regulatorios que involucran sensores al estrés, rutas de señalización que comprenden una red de reacciones entre proteínas, factores de transcripción, promotores y finalmente la producción de proteínas y metabolitos (Bartels & Sunkar, 2005). La sequía y salinidad provocan muchas reacciones comunes en plantas; por ejemplo, una deshidratación celular, causada por el resultante estrés osmótico, remueve el agua del citoplasma dentro del espacio extracelular y causa una reducción de volumen citosólico y vacuolar. Otra consecuencia es la producción de especies reactivas de oxígeno, que a su vez afectan negativamente las estructuras celulares y el metabolismo. Estos cambios alteran procesos metabólicos vitales para la planta, como por ejemplo aquellos que involucran rutas de señalización reguladas por hormonas y la capacidad fotosintética.

En la salinidad, las altas concentraciones de sodio intracelular y iones cloruro son un problema adicional (Bartels & Sunkar, 2005), ya que el Na^+ , al acumularse dentro de las células de la planta puede modificar la membrana lipídica y la composición de las proteínas, causando un desequilibrio iónico, que a su vez, afecta el crecimiento normal y desarrollo (Lei *et al.*, 2009; Rodríguez & Salinas, 2009). Las adaptaciones moleculares de las plantas al estrés salino involucran la activación de rutas de regulación controladas por el ácido abscísico (ABA), una fitohormona que juega un papel central en muchos aspectos de respuesta a estrés, que también regula el desarrollo de la semilla, y la dormancia, y germinación (Leung & Giraudat, 1998). La señalización por ABA es inducida por la acumulación de las especies reactivas de oxígeno y por factores de transcripción

(FT) inducibles por exceso de sal (Sakamoto *et al.*, 2008; Rodríguez & Salinas, 2009). Para restablecer la homeostasis celular y el funcionamiento normal bajo estrés salino, los FT activados regulan la expresión de genes que, a su vez, codifican proteínas que contribuyen a la tolerancia a la sal o la actividad de enzimas que intervienen en vías que conducen a la protección y reparación de células, por ejemplo, la biosíntesis de agentes antioxidantes (Flowers, 2004; Munns & Munns, 2005).

Por otro lado, la sequía tiene como consecuencia del cierre de estomas y la reducción de la velocidad de transpiración, que son medidas para evitar disminuciones severas en el potencial de agua en los tejidos de la planta. Ésta causa, a su vez, inhibición del crecimiento, disminución de la actividad fotosintética y la generación de metabolitos tóxicos que causan la muerte celular en la planta (Yordanov *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2009), seguido de las respuestas fisiológicas. Las plantas también experimentan cambios morfológicos en respuesta a la falta de agua, como la acumulación de ceras en las hojas o engrosamiento de la pared celular de las mismas, entre otros (Vassileva *et al.*, 2012).

2.2 Estrés biótico por insectos herbívoros, patógenos y daño mecánico

En la naturaleza las plantas interactúan con insectos, virus, nemátodos, bacterias y hongos, entre otros. Existen evidencias que indican que cuando los niveles de daño son bajos, éstos pueden ser completamente compensados por las plantas. Sin embargo, al incrementar la intensidad del daño, disminuye la capacidad de tolerarlo por completo (Chapin & Mcnaughton, 1989). Cuando una planta detecta un organismo invasor, activa su metabolismo, induciendo una sobre regulación de genes asociados a la producción de metabolitos y proteínas de índole defensiva, tales como inhibidores de proteasas, toxinas, volátiles que repelen al atacante y/o atraen a sus enemigos naturales (Bruce & Pickett, 2007).

Para el caso de la interacción planta-herbívoro, las plantas pueden responder al ataque con la producción de defensas químico-biológicas y físicas, comúnmente denominada “resistencia directa”, utilizando agentes tóxicos y/ o antinutritivos y barreras físicas que dificultan la alimentación del herbívoro. Otra manera de respuesta es mediante la

redistribución de nutrientes y reservas de carbono y nitrógeno para dejarlas fuera del alcance del herbívoro, para luego ser utilizadas durante el proceso de recuperación al daño. Esta respuesta es conocida comúnmente como “tolerancia” (Howe & Jander, 2008). Dentro de las distintas formas de responder al estrés existen una variedad de moléculas que actúan como defensa directa promoviendo efectos tóxicos, repelentes o antidigestivos en los herbívoros. Algunos ejemplos son los glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, alcaloides, fenoles, inhibidores de proteasas, además de algunas barreras físicas que se interponen contra los insectos, como las cutículas, espinas y tricomas (Bennett & Wallsgrave, 1994). Como un mecanismo de defensa indirecto las plantas emiten compuestos volátiles o producen néctar extrafloral, mismos que permiten atraer a los predadores naturales de los herbívoros, mediante volátiles específicos, o promover la defensa de la planta por colonizadores que se alimentan del néctar (Heil, 2008).

Para mantener un balance entre crecimiento y defensa y no afectar negativamente a los procesos de desarrollo y reproducción de la planta, las plantas utilizan, durante el proceso llamado de "tolerancia", mecanismos sofisticados de regulación que permiten almacenar azúcares en tejidos no susceptibles para tolerar la herbivoría, y permitir la posterior recuperación sin sufrir un gasto metabólico importante (Schwachtje *et al.*, 2006).

Algunas especies de patógenos son capaces de entrar a la planta a través de aperturas naturales; otras penetran directamente mediante la degradación de las capas superficiales de los tejidos vegetales y/ o por presión mecánica. Dichos ataques producen síntomas característicos en la planta afectada, como necrosis, manchas y clorosis, entre otros. La planta debe ser capaz de detectar el ataque lo antes posible para evitar la proliferación del agresor; un mecanismo de defensa conocido como respuesta hipersensible (RH), es activado por ciertas plantas para defenderse de ciertos patógenos. Durante la RH, el tejido se sensibiliza al patógeno, resultando en una muerte programada rápida de las células vegetales locales, que atrapan al patógeno. Esto limita efectivamente la dispersión de la infección (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Las bacterias patógenas usan estrategias de virulencia y usualmente se especializan en la invasión de ciertos tejidos de las plantas, como raíces y hojas. La virulencia de las bacterias es manifestada por la velocidad de crecimiento, el aumento de síntomas y el

desarrollo de la enfermedad, lo cual promueve la dispersión del patógeno a través de la planta. Existen defensas estructurales en la planta, que son barreras de tipo físico o químico que incluyen espinas, tricomas, cutícula superficial de la hoja y ceras protectoras de diversos órganos, así como metabolitos secundarios existentes en plantas sanas, conocidos como fitoanticipinas, las cuales son tóxicas a los atacantes no especializados. El grosor y la composición de la pared celular son un factor importante en la generación de resistencia a la entrada de patógenos, aunque éstos pueden alcanzar el interior a través de heridas presentes en la superficie de la planta, o a través de los estomas (Van Loon *et al.*, 1994)

Las plantas emplean numerosas señales originadas por los microorganismos y el ambiente, que les permite reconocer al patógeno y activar sus mecanismos de defensa (Halversont & Stacey, 1986). Este reconocimiento ocasiona la activación de una ó más rutas de transducción de señales, y la síntesis de compuestos relacionados con defensa. La síntesis de ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), etileno (ET) y otros compuestos es necesaria para la activación de genes de defensa. Entre las numerosas proteínas/péptidos relacionadas con defensa, cuya acumulación es regulada por AJ, se incluyen enzimas involucradas en síntesis de alcaloides, inhibidores de proteasas (IP), polifenol oxidasas y péptidos antimicrobianos. Éstas pertenecen al grupo de defensas inducibles (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Shirasu *et al.*, 1997); que pueden activarse de manera localizada en el área del daño, o bien, tener un efecto sistémico, al activarse en el resto de la planta.

La denominada resistencia sistémica adquirida (RSA) consiste en la generación de resistencia frente a patógenos en tejidos vegetales que no han estado en contacto con éste, e involucra la inducción de distintas proteínas relacionadas a patogénesis, conocidas como proteínas PR (Ryals *et al.*, 1996). Además de la RSA, existe otro tipo de respuesta denominada resistencia sistémica inducida (RSI) que también provee protección contra una amplia gama de patógenos. Esta respuesta es inducida por rizobacterias promotoras del crecimiento, pero es independiente de AS, ya que está regulada por AJ, ET y la proteína reguladora NPR-1 (Knoerster *et al.*, 1998). Otra vía de defensa importante es la mediada por ET, un compuesto volátil generado en el sitio del daño provocado por herbívoros ó patógenos. Se cree que el ET funciona como inductor

en la síntesis de genes o estructuras defensivas como lignina, proteínas PR y de la fenilalanina amonio liasa (PAL), la enzima clave para la síntesis de fenilpropanoides.

Es evidente que las plantas tienen la capacidad de encender rutas de señalización contra diferentes tipos de agresores. La comunicación cruzada entre estas vías constituye un complejo mecanismo regulatorio en la activación o represión de estrategias defensivas, la cual determinará si una interacción será sinérgica o antagónica (Pieterse *et al.*, 1996)

Para evitar el gasto de recursos de defensa en las plantas, estas deben diferenciar el ataque de un insecto de un simple daño mecánico, tal como el causado por granizo o el viento en el entorno natural. Sin embargo, algunos genes de defensa se pueden expresar tanto en herbivoría como daño mecánico. En contraste, la herbivoría por insectos puede inducir la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos específicos conocidos como fitoalexinas y otras respuestas defensivas que usualmente también involucra la acumulación de proteínas tóxicas para el herbívoro (Howe & Jander, 2008).

Existen ensayos de microarreglos realizados en diferentes especies, incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Reymond *et al.*, 2004), *Nicotiana attenuata* (Voelckel *et al.*, 2004), *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* (Ralph *et al.*, 2006), en los cuales se han realizado comparaciones de patrones de expresión de genes inducidos por daño mecánico, herbivoría o simulación de herbivoría. Aunque hay un considerable traslape de patrones de expresión de genes, también hay respuestas transcripcionales que parecen ser específicas del daño causado por herbívoros o por la aplicación de secreciones orales del insecto en el sitio de daño.

Hay dos teorías principales para explicar cómo las plantas discernen la diferencia entre el ataque de un herbívoro del daño mecánico. La primera, es que las plantas reconocen componentes en las secreciones orales del atacante. Este punto de vista es apoyado por la identificación de varios factores derivados del insecto que provocan una respuesta de defensa, cuando se aplican directamente sobre heridas artificiales causadas mecánicamente. Las plantas también pueden diferenciar el daño mecánico de la herbivoría a través del uso de un mecanismo aún desconocido, capaz de medir la cantidad y calidad del tejido dañado (Mithofer *et al.*, 2005).

Por ejemplo, la alimentación de larvas masticadoras, involucra la acción de mandíbulas especializadas que remueven tejido foliar de un mismo tamaño y una manera repetitiva que se hace predecible (Mithofer *et al.*, 2005). Una aproximación en el estudio de la función de la saliva del insecto en interacciones planta lepidóptero, por ejemplo, se obtuvo al retar plantas con larvas de *Helicoverpa zea* (gusano elotero), a las que se les habían removido las glándulas salivales previamente al ataque. Los experimentos de tales experimentos demostraron claramente que las secreciones orales (SO) afectan cualitativamente la respuesta de defensa de la planta (Musser *et al.*, 2006). Un segundo enfoque se obtuvo al retar a las plantas con un dispositivo mecánico capaz de mimetizar el daño causado por estas larvas (Mithofer *et al.*, 2005). Estos experimentos mostraron que daños mecánicos repetitivos en hojas de *Phaseolus lunatus* (frijol lima) provocaron un patrón de emisión de volátiles que fue cualitativamente similar al inducido por el ataque de las larvas. Estos resultados dejaron en claro que los patrones de daño mecánico son un determinante crítico de la respuesta de defensa del hospedero hacia el ataque de insectos masticadores defoliadores.

2.3 Modelo de estudio: El amaranto

2.3.1 Generalidades

El amaranto (*Amaranthus* spp.) o “huauhtli”, en náhuatl, ha sido cultivado desde la época prehispánica (Caselato-Sousa & Amaya-Farfán, 2012), tiempo en el cual tenía gran importancia como alimento y elemento simbólico en la cosmovisión mesoamericana. Al igual que el maíz, se utilizaba en las ceremonias relacionadas con la fertilidad y el ciclo agrícola (MacNeish, 1964). Es una planta dicotiledónea, herbácea, que produce semillas tipo granos; la forma más común de la hoja es elíptica con una punta aguda. La planta mide de 0.5 a 3.0 m de altura, con raíces pivotantes, extensas (de hasta 1.8 m) y muy ramificadas; con tallos que alcanzan de 0.4 a 3 m de longitud. La inflorescencia del amaranto corresponde a panojas muy vistosas de diversos colores desde el color amarillo, anaranjado, café, rojo, rosado, hasta el púrpura; y que pueden ser totalmente erectas hasta decumbentes de 0.5 a 0.9 m. El amaranto de grano es capaz de crecer óptimamente, a un rango de pH de neutro a alcalino, y bajo condiciones limitadas de

nutrientes. Su ciclo de vida es variable, desde los 70 a los 240 días (Espitia Rangel *et al.*, 2012; Brenner *et al.*, 2015)

El género *Amaranthus*, pertenece a la familia *Amaranthaceae* del orden de Caryophyllales, constituido aproximadamente por 70 especies (Délano-Frier *et al.*, 2011). La mayoría de las especies están distribuidas en regiones templadas y tropicales del mundo.

Existen tres especies principales que mayormente se utilizan para la producción de grano debido al alto valor nutrimental de sus semillas y hojas (Costea & DeMason, 2014), como *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*. Sauer, 1967 indica que *A. hypochondriacus* es originario de México, debido a que se le cultivaba desde el tiempo de los aztecas, actualmente se sigue cultivando y se encuentra ampliamente distribuido en México. También, se cultiva en Nepal y en el sur de la India donde se han formado centros secundarios de diversificación. Según Grubben & Sloten., 1981, *A. cruentus* L., es una especie originaria de América Central, probablemente de Guatemala y el sureste de México, donde se cultiva y se encuentra ampliamente distribuida mientras que *A. caudatus* es de día corto y se adapta mejor que las otras especies a bajas temperaturas. Ésta es originaria de los Andes y de aquí se distribuyó a otras zonas templadas y subtropicales (Grubben, 1975).

2.3.2 Importancia nutricional.

En los últimos años, se incrementó el interés por el estudio de este cultivo principalmente por su alto contenido nutricional y por su elevado potencial agronómico (Kadereit *et al.*, 2003; Huerta *et al.*, 2009). Las semillas de amaranto contienen niveles elevados de proteína total, pero su importancia no radica sólo en la cantidad sino en la calidad de la semilla, gracias al equilibrado contenido de aminoácidos esenciales como la lisina y metionina, que son limitantes en cereales y leguminosas, respectivamente (Bressani *et al.*, 1987; Belton & Taylor, 2002; Huerta *et al.*, 2009). Las hojas tienen un alto contenido de calcio, magnesio, hierro, fósforo, vitaminas, como riboflavina, niacina y ácido ascórbico (Barba de la Rosa *et al.*, 2007).

El consumo de la hoja y / o del grano de amaranto puede ser benéfico debido a sus características nutraceuticas y bioactivas. Entre las características nutraceuticas identificadas, principalmente en granos, están la actividad antihipertensiva, antitumoral, antidiabética, antioxidante, antidiarreica y antifúngica. Además, se ha identificado el potencial que tiene para prevenir algunos tipos de cáncer (Marccone *et al.*, 2004; Martirosyan *et al.*, 2007; Venskutonis & Kraujalis, 2013)

2.3.3 Respuestas del amaranto a condiciones de estrés.

El elevado potencial agronómico que tiene el cultivo de amaranto se basa, en parte, a su capacidad de crecer en diversos tipos de suelo no aptos para otras plantas, como cereales. Otros factores que contribuyen a esta cualidad son su capacidad de tolerar, por ejemplo, al déficit de agua, altas o bajas temperaturas y suelos salinos. Debido a lo anterior, el amaranto presenta una alternativa para las regiones donde no es posible cultivar a los cereales o verduras (Omami *et al.*, 2006). Su alta tolerancia a estas condiciones desfavorables se debe parcialmente a su elevada eficiencia en el uso del agua, la cual es atribuida a su fisiología C₄, junto con la generación de raíces principales largas, así como de raíces laterales extensas, en respuesta a la falta de agua en el suelo. Además, se ha señalado que su eficiencia de uso de agua es superior a varios cultivos C₃ y C₄, entre ellos trigo, maíz, algodón y sorgo (Espitia Rangel *et al.*, 2012).

Asimismo, se ha determinado que la resistencia al estrés en el amaranto, incluye la capacidad de acumular solutos compatibles (Espitia Rangel *et al.*, 2012), la expresión de genes relacionados al estrés, que permiten evitar el estrés oxidativo que se genera por la formación de las especies reactivas de oxígeno durante el estrés (Chaves & Oliveira, 2004; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014) y factores de transcripción. Además muestra una respuesta rápida ante inductores químicos de defensa como AJ (Délano Frier *et al.*, 2004) y benzotriazol un derivado del AS (Casarrubias-Castillo *et al.*, 2014), y así aumentar su resistencia contra ciertos insectos plaga, como insectos chupadores, o contra bacterias patógenas (Massange Sánchez *et al.*, 2015). Por otra parte, el amaranto de grano también muestra una tolerancia excepcional a la defoliación severa (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012; Vargas-Ortiz *et al.*, 2013). Esto ha sido asociado a una utilización

eficiente de las reservas de carbono que se encuentran almacenadas en tallo y raíz (Vargas-Ortiz *et al.*, 2013).

En el 2011 se reportó un análisis transcriptómico de amaranto de grano (*A. hypochondriacus*) el cual permitió la identificación de 1,971 genes que aumentaron su expresión en condiciones adversas (sequía, salinidad, herbivoría e infección bacteriana). Entre los diversos genes, se identificaron algunos estimulados por el estrés, otros involucrados en procesos de desarrollo, en procesos biológicos, por ejemplo, en defensa principalmente contra insectos herbívoros, relacionados con AJ o infección bacteriana y, por último, genes función desconocida. Se sugirió que éstos últimos podrían tener una potencial aplicación agro-biotecnológica (Délano-Frier *et al.*, 2011). El amaranto, es un organismo diploide ($2n = 32$) con un tamaño de genoma estimado en 466 Mb. Recientemente se publicó que el genoma del amaranto de grano consiste de 377 Mb, 48% de las cuales se encuentran en forma de secuencias repetitivas. La anotación del mismo permitió la identificación de 23,059 genes codificantes de proteínas (Clouse *et al.*, 2016).

La expresión de los genes inducidos en condiciones de estrés puede clasificarse en tres grupos 1) genes que codifican para proteínas con función enzimática o funciones estructurales conocidas, 2) proteínas de función desconocida y 3) proteínas reguladoras (Bhatnagar Mathur *et al.*, 2008). Actualmente, existen investigaciones enfocadas a la búsqueda de genes de función desconocida, que podrían ser parte de nuevas vías de señalización inducidas en condiciones ambientales adversas y al estudio de proteínas reguladoras, particularmente FT, que también son de gran interés, debido a su conocido papel como reguladores multigénicos.

2.4 Proteínas de función desconocida

Existen genes con secuencias codificantes absolutamente únicas para una especie en particular. En otras palabras, son genes que producen proteínas novedosas, usualmente de función desconocida y que sólo se encuentran en un limitado número de órdenes de plantas, que casi siempre no incluyen a aquellos pertenecientes a las plantas modelo, o a cultivos comerciales. Es por ello que estos genes se conocen como “genes huérfanos” (Arendsee *et al.*, 2014). Estos genes parecen tener un papel en respuesta al medio ambiente (Luhua *et al.*, 2013). Otro aspecto importante fue reportado por un estudio que

mostró que más del 80% de los mutantes *knockout* de genes de función desconocida en *A. thaliana* tenían un fenotipo alterado cuando estaban sometidos a estrés, que usualmente les confería protección contra el estrés, en parte por su función como supresores de efectos dañinos del estrés abiótico, como el oxidativo y osmótico.

Muchas proteínas hipotéticas son proteínas que están codificadas por un gen huérfano cuya secuencia es conocida pero estructural y funcionalmente no se han caracterizado (Galperin & Koonin, 2004; Bidkar *et al.*, 2014). Un dominio es una unidad o porción en una proteína que se pliega de manera independiente, y que normalmente es responsable de una función o interacción particular, contribuyendo a la función general de una proteína (Zúñiga & Gamboa de Buen, 2012). Actualmente, se ha desarrollado una gran cantidad de información genómica y transcriptómica utilizando un amplio espectro de herramientas bioinformáticas y experimentales para la anotación de las proteínas (Loewenstein *et al.*, 2009). Sin embargo, relacionar la enorme cantidad de información con el significado biológico de las secuencias de los genes representa un gran reto, debido, en gran medida, al alto número de las proteínas identificadas de función desconocida (PUF, por sus siglas en inglés) en las bases de datos (Dhanyalakshmi *et al.*, 2016). En un sistema de plantas modelo como *A. thaliana*, aproximadamente 30-34% del genoma total está compuesto de PUF (Lamesch *et al.*, 2011).

Se han reportado investigaciones en diversos organismos para elucidar el papel biológico de las PUF, enumerando su importancia funcional en el crecimiento, desarrollo, supervivencia y respuesta a condiciones ambientales adversas (Guengerich *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2011). La abreviatura "DUF" (del inglés, *Domain of Unknown Function*) se refiere a los dominios conservados de proteínas que carecen de una función asignada en la base de datos de Pfam (Finn *et al.*, 2014). La presencia de estos motivos en ciertas proteínas puede ayudar a determinar su función (Punta *et al.*, 2012).

Muchas plantas contienen proteínas de unión a carbohidratos llamadas lectinas, aglutininas o hemaglutininas, las cuales difieren dependiendo de su estructura molecular, propiedades bioquímicas, y la especificidad de unión a carbohidratos (Damme *et al.*, 1998). El gen *Hfr-2* (del inglés, *Hessian fly responsive -2*), contiene dos dominios similares que codifican para una aglutinina específica de *A. caudatus*, y para una proteína hemolítica que es capaz de formar poros en las membranas celulares en mamíferos. Se

ha encontrado que la expresión de *Hfr-2* aumenta cuando plantas de trigo son atacadas por los insectos herbívoros *Spodoptera frugiperda* (del gremio de los masticadores) y el áfido *Rhopalosiphum padi* (del gremio de los chupadores). Por otra parte, se ha propuesto que la proteína puede ayudar al desarrollo de las larvas de la mosca Hess (Puthoff *et al.*, 2005).

Existen una serie de proteínas asociadas con la senescencia de plantas. Por ejemplo, en *Hemerocallis*, los pétalos tienen un programa basado genéticamente que conduce a la senescencia y a la muerte celular aproximadamente 24 h después de que la flor se abre, y se cree que las proteínas de la senescencia producidas alrededor de ese tiempo desempeñan un papel en este programa (Panavas *et al.*, 1999). El gen *ERD7* (del inglés *Early-Responsive to Dehydration*) de amaranto contiene un dominio que codifica para proteínas involucradas en el proceso de senescencia.

2.4.1 Familia DUF642

La familia DUF642 constituye un grupo de proteínas altamente conservado, usualmente asociadas a las paredes celulares, específicas para espermatófitas (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014). Las proteínas DUF642 tienen una estructura básica dividida en dos dominios y un péptido señal de 20 a 30 aminoácidos; el subdominio N-terminal no tiene función, mientras que el subdominio C-terminal tiene homología con un dominio de unión a carbohidratos (Zúñiga & Gamboa de Buen, 2012). De los diez miembros de esta familia presentes en *Arabidopsis*, seis de ellos han sido encontrados en pared celular (i. e., *At3g08030*, *At2g41800*, *At1g80240*, *At5g25460*, *At4g32460* y *At5g11420*) (Zúñiga & Gamboa de Buen, 2012).

El estudio de *At5g25460* constituye uno de los pocos estudios funcionales sobre esta familia de proteínas. Ésta se encontró altamente expresada en plántulas durante las primeras etapas de desarrollo, mientras que una mutante mostró tener raíces más cortas y rosetas más pequeñas que la planta silvestre (Gao *et al.*, 2012). En un estudio relacionado, se encontró que en semillas de *Brassica oleracea* la expresión de un ortólogo de la *At5g25460* aumentó durante la germinación (Soeda *et al.*, 2005). Por otra parte, también han sido detectados cambios en la expresión de genes DUF642 bajo condiciones ambientales específicas. Por ejemplo el estrés salino promueve la expresión

del gen At2g41810 (Kreps *et al.*, 2002). En otra investigación se encontró que la sobreexpresión del gen *DGR2* de amaranto de la familia DUF642 en plantas de *A. thaliana* se induce bajo condiciones de estrés abiótico, modificando la estructura de la pared celular y causando, además, hipersensibilidad a sal y ABA (Palmeros-Suárez *et al.*, 2016).

2.5 Factores de transcripción

Los FT activan cascadas de señalización de genes que actúan corriente abajo en la regulación de respuestas que confieren tolerancia a múltiples tipos de estrés. Esto ocurre mediante la interacción de los TF con los elementos de acción cis presentes en la región promotora de sus genes blanco. Además, la respuesta de ciertos FT permite que al ser insertados en otras especies vegetales, se induzca o reprima el amplio grupo de genes que se encuentran bajo su control (Vinocur & Altman, 2005). Los factores de transcripción se clasifican en varias familias, tales como AP2 / ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC, Cys2His2 dedo de zinc y WRKY. Cada miembro responde de manera diferente a los estímulos de estrés, de forma positiva o negativa, dependiendo de las circunstancias (Akhtar *et al.*, 2012)

Se encontró que algunos genes que codifican para FT que contienen el miembro Cys2/His2 tipo dedos de zinc, son regulados por el estrés abiótico en *Arabidopsis*. Por ejemplo, el *AtDi19* (del inglés, *Drought-induced*), funciona como un regulador transcripcional y está involucrado en la respuesta a estrés por sequía, al observarse que en la mutante insercional *di19*, las plantas de *Arabidopsis* fueron más sensibles a sequía y que la sobreexpresión de *Di19* ocasionó mayor tolerancia a estrés por sequía comparado con las plantas silvestres (Liu *et al.*, 2013). Otro trabajo reportado mostró que la proteína con dominio de dedos de zinc *ZPT2* actúa como represor transcripcional, desregulando la actividad de otros FT (Sakamoto *et al.*, 2004).

Las investigaciones muestran que un mismo FT puede actuar como inductor y represor de la respuesta a estrés en plantas, mostrando, de esta manera, la interacción compleja y coordinada que existe entre las vías de señalización de la respuesta a estrés.

Otros factores de transcripción que han sido estudiados son las proteínas que presentan un homeodominio de cremallera de leucina o HD-Zip, las cuales constituyen una amplia familia de FT que se encuentran únicamente en plantas. Las proteínas HD-Zip se caracterizan por tener un homeodominio de unión a DNA y un motivo adyacente ZIP (o de cremallera de leucina) que media la dimerización de la proteína (Ariel *et al.*, 2007). Se han realizado estudios que demuestran que las proteínas HD-ZIP están involucradas principalmente en estrés, y que su expresión es regulada por sequía, temperaturas extremas, estrés osmótico y hormonas, como ABA y ET (Zhao *et al.*, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

El análisis de genes de función desconocida en amaranto de grano inducidos por estrés, podría revelar mecanismos novedosos de tolerancia al estrés en estas plantas y en otros cultivos de interés agronómico.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

1. Analizar genes de función desconocida de amaranto de grano en múltiples condiciones de estrés.

4.1.1 Objetivos específicos

- Seleccionar genes de función desconocida en el transcriptoma de *A. hypochondriacus*.
- Determinar mediante qRT-PCR los niveles de expresión de estos genes en los diferentes tejidos, estados específicos de desarrollo y especies de amaranto de grano
- Determinar mediante qRT-PCR los niveles de expresión de estos genes bajo diversas condiciones de estrés (defoliación, salinidad, sequía, infección bacteriana, y herbivoría).

- Generar una construcción con el promotor de un gen, seleccionado por sus características de interés relacionadas a la tolerancia a estrés, fusionado a un gen reportero.
- Generar una construcción para la sobreexpresión del gen seleccionado.

V. METODOLOGÍA

5.2 Material biológico

Todos los experimentos se realizaron con plantas de *Amaranthus hypochondriacus* var. Revancha, *Amaranthus cruentus* var. Amaranteca y *Amaranthus caudatus*. Las plantas utilizadas en los experimentos tenían de cuatro a cinco semanas de edad. Fueron sembradas originalmente en charolas de germinación de poliestireno de 60 cavidades, previamente llenadas con una mezcla (1: 1) de pasta de coco con mezcla general (pajote de jardín, limo, “Sunshine Mix 3” [SunGro Horticulture, Bellevue, WA], vermiculita y perlita en relación 2: 1: 3: 1: 1). Se colocaron dos semanas después de su germinación en macetas de 1.3 L, conteniendo un substrato estéril compuesto por tres partes de mezcla *Sunshine 3TM*, una parte de greda rica en humus, dos partes de turba, una parte de vermiculita (SunGro Hort) y una parte de perlita (Termolita S.A., Nuevo León, México). Se fertilizaron una semana posterior a su transplante con una mezcla 20: 10: 20 (N: P: K) en solución de acuerdo con las instrucciones de manufactura (Peters Professional; Scotts-Sierra Horticultural Products, Marysville, OH, EUA). Los experimentos se desarrollaron en cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura (26°C) y fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad).

5.2 Condiciones de estrés en amaranto

5.2.1 Experimento de alta salinidad

Para aplicar el estrés salino, las plantas se regaron primero hasta saturación con agua corriente y después diariamente con 100 ml de NaCl 400 mM durante ocho días, tiempo durante el cual se midió la conductividad eléctrica (CE; en dS/ m) en el suelo, utilizando

un medidor Hanna modelo HI 98130 (Hanna instruments Inc., Woonsocket, RI, EUA), con una conductividad promedio de 12.1 dS/ m al finalizar el estrés. Este nivel de salinidad inadecuado para la mayoría de los cultivos, ya que componente seriamente el rendimiento. El máximo, soportado todavía por plantas halófitas, es de > 16 dS/ m.

5.2.2 Experimento de herbivoría

El experimento de herbivoría se desarrolló colocando tres larvas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae) del tercer estadio larval por planta, (sin alimentar por 12 a 16 h.), la cual fue cubierta con una malla para restringir el movimiento de las mismas. Las larvas se alimentaron del follaje de las plantas durante 17 h porque en este periodo la pérdida de área foliar sufrida por la herbivoría durante este periodo fue alrededor del 70% de las hojas. Posteriormente, se colectó el material vegetal 6, 12 y 24 h después de haber retirado las larvas. Las hojas con pérdida de tejido foliar se utilizaron para evaluar la respuesta local, mientras las hojas intactas, para la respuesta sistémica. Las plantas control fueron expuestas a las mismas condiciones, sólo que en ausencia de larvas. Asimismo, se colectó el tallo y raíz para cada tratamiento.

5.2.3 Experimento de defoliación

El ensayo fue realizado con plantas de *A. cruentus* var. Tarasca, sin defoliación (“plantas control”) y una defoliación total (“plantas defoliadas”). El experimento se realizó en cuatro etapas de desarrollo distintas, llamadas: Vegetativa 1 (V1, 6-8 hojas verdaderas [hv], 4-5 semanas después de germinación [sdg]); Vegetativa 2 (V2, 14-16 hv, 6-7 sdg); Emergencia de Panoja (EP, ó aparición de inflorescencia, 9-10 sdg) y Floración (FL, ~50% de antesis, 11-12 sdg). La defoliación fue realizada en todas las hojas de las “plantas defoliadas” gradualmente durante tres días consecutivos hasta alcanzar la defoliación total, utilizando una perforadora metálica para papel. El primer día se perforó aproximadamente el 33% de la superficie de las hojas; el segundo día se perforó aproximadamente un 33% adicional de la superficie de las hojas. Finalmente, el tercer día se cortó, con tijeras metálicas, la totalidad de las hojas desde la base de las mismas.

Estas hojas, con ca. 67% de pérdida de área foliar, fueron las utilizadas para posteriores análisis. Las plantas defoliadas en su totalidad permanecieron un día adicional en este estado. Después del cual, se colectaron raíces y tallos (para el caso de las etapas V1 y V2), o raíces, tallos y panojas (para el caso de las etapas EP y FL). Asimismo, se colectaron las raíces, tallos y hojas (para el caso de las etapas V1 y V2) o raíces, tallos, hojas y panojas (para el caso de las etapas EP y FL) de las “plantas control”, no defoliadas (Vargas-Ortiz *et al.*, 2013; Cisneros-Hernández, 2016).

5.2.4 Experimento de sequía

Al inicio del experimento, y para calcular el porcentaje de humedad en el sustrato, las macetas fueron saturadas con agua, después se dejó que drenara libremente hasta que no hubo cambio en peso. La diferencia entre este peso saturado con agua (PA) y el peso seco (PS) fue usado para calcular el 100% de la capacidad de retención de agua (CRA). Todas las macetas fueron irrigadas hasta el 90% de su CRA donde $CRA = PA - PS$, hasta que alcanzaron de 10 a 12 hojas. En este estado de desarrollo se comenzó la aplicación de los tratamientos. Durante la realización de los experimentos las macetas se pesaron diariamente, y aproximadamente a la misma hora, para calcular el CRA del suelo y así mantener la humedad óptima. Cada uno de los tratamientos consistió en que el sustrato perdiera la humedad hasta alcanzar el porcentaje deseado. Se sembraron un total de 12 plantas para cada uno de los tratamientos de estrés: el primer grupo correspondió a las plantas control o bien regadas (CT), el segundo grupo a plantas crecidas hasta alcanzar un 30% de humedad en el suelo, o “estrés hídrico moderado (EM)”, y el tercero, a plantas crecidas hasta alcanzar un 10% de humedad en el suelo, o “estrés severo (ES)”. El cuarto grupo correspondió a las plantas que alcanzaron el ES y se les aplicó un riego de recuperación (REC), siendo colectadas 24 h después. Las 12 plantas utilizadas por tratamiento fueron combinadas en 3 pozas de 4 plantas cada una, de las cuales se colectaron raíz, hoja y tallo para cada tipo de estrés (González Rodríguez, 2016).

El material se colectó y se congeló de inmediato en N₂ líquido. Posteriormente se almacenó a -80° C en un ultra-congelador Revco (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a -80°C hasta su utilización.

5.2.5 Experimento de infección bacteriana con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) y *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*)

Para este experimento se prepararon medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias. Para *Cmm* (cepa virulenta “acr42”, donada por el Dr. Ángel Alpuche, del IPICYT) se usó el medio 802 (peptona 1gr/ L, extracto de levadura 2 g/ L, MgSO₄ 7 H₂O 0.92 g/ L y Agar 15 g/ L), empleando 20 µl de la bacteria en la placa, mediante siembra por estría, incubando durante 48 h a 28°C. Para *Pss* (cepa avirulenta “3525”) se usó el medio KB (bactopeptona 10 g/ 500 mL, fosforo dibásico potásico 0.75 g/ 500mL, glicerol 0.75 mL/ 500 mL, Agar 705 g/ 500 mL) y al igual que *Cmm*, se sembró 20 µl de la bacteria en la placa con el medio y se incubó durante 24 h en un cuarto de crecimiento a 28°C. Una vez pasado el tiempo de crecimiento se diluyeron las dos muestras en un buffer de fosfatos estéril 0.05 M a pH 7.0, hasta lograr una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0.2 para *Pss* y 0.3 para *Cmm* (Casarrubias-Castillo *et al.*, 2014).

Se inocularon 48 plantas de amaranto de cuatro semanas de edad para cada una de las bacterias, 24 plantas fueron inoculadas con un volumen de 400 µL de la suspensión de *Pss* por planta, distribuido en el envés de cuatro hojas jóvenes cercanas al meristemo y el grupo restante inoculado con buffer de fosfatos por cada tiempo de colecta, utilizando una jeringa de 1 mL. Se colectaron en un conjunto de 3 plantas por cada tiempo de colecta, considerando la hoja infectada (respuesta local) y la hoja distal (respuesta sistémica). Para el caso de las plantas tratadas con *Cmm*, el número de plantas fue el mismo, pero al inocular se utilizó un volumen de 500 µl de la suspensión bacteriana por planta distribuidos de la siguiente manera: 400 µL de la suspensión, distribuido en el envés de cuatro hojas jóvenes cercanas al meristemo, y 100 µl en el tallo. Se colectaron las hojas infectadas, las hojas distales no infectadas, el tallo y la raíz para cada tratamiento, a las 6, 12, 24 y 48 h posteriores a su inoculación. Se colectaron tejidos de las tres variedades de amaranto grano, los cuales se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta su uso a -80°C. Para su análisis, los tejidos de las plantas de amaranto infectadas con *Pss* o *Cmm* se pulverizaron con nitrógeno líquido.

5.3 Escrutinio de genes de función desconocida

Las secuencias de los genes de función desconocida de interés para este trabajo fueron identificadas en la base de datos del transcriptoma de *A. hypochondriacus* sometido bajo cuatro condiciones de estrés (a)biótico (Délano-Frier *et al.*, 2011). Estas secuencias fueron traducidas *in silico* con el programa *Expasy translate tools* (<http://web.expasy.org/translate/>), tomando en cuenta el marco de lectura abierto que codifica para el polipéptido de mayor longitud. Para cada gen se realizaron alineamientos utilizando la herramienta bioinformática BLAST, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar la identidad de los genes de *A. hypochondriacus* en *Beta vulgaris* y *A. thaliana*. Además, la traducción *in silico* de la secuencia permitió encontrar algunos dominios conservados. Para analizar los codones de inicio y paro de la traducción de las secuencias, la región promotora de los genes, se utilizó el genoma de *A. hypochondriacus* mediante el programa *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Algunas características de los genes seleccionados se incluyen en el APÉNDICE 3.

5.4 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos para la cuantificación de la expresión génica se realizó utilizando el programa bioinformático *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), *Beacon Designer* (<http://www.premierbiosoft.com>), *UNAFold* (<http://www.idtdna.com/UNAFold>) y *Oligo Evaluator* (<http://www.oligoevaluator.com>). Las características de estos se encuentran en el APÉNDICE 1 (Thornton & Chhandak, 2011)

5.5 Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído empleando el reactivo TRIzol® (Life technologies, Carlsbad, California, EUA) a partir de 100-200 mg de tejido congelado previamente molido con N₂ líquido. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones en la adición de una mezcla de sales (citrato de sodio 0.8 M y cloruro de sodio 1.2 M), isopropanol en relación 1: 1 (v/ v) para la precipitación de ARN durante 15 min a 4°C. Después se adicionó una solución de cloruro de litio 8 M para

purificar durante 1 h a 4°C. Al finalizar la extracción, se observó la integridad del ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa (1%) siendo desnaturalizado el ARN previamente (i. e. usando formaldehído-formamida) y visualizado con luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio. La integridad se determinó a través de las bandas de ARN ribosomal (i. e., 18S y 28S), mientras que la pureza y concentración fueron determinadas por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Waltham, Massachusetts, EUA).

5.7 Síntesis de ADN complementario y análisis de expresión mediante qRT-PCR

El ADNc fue sintetizado a partir de 4 µg de ARN total utilizando 200 unidades de la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), oligo(dT)₂₀, acorde a las instrucciones del fabricante). El ADNc obtenido se diluyó 25 veces con agua desionizada y se empleó para realizar el análisis de expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$

La amplificación se llevó a cabo empleando placas de 96 pozos en el equipo CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µL, conteniendo 2 µL del cDNA, 4 µL de cada oligonucleótido a una concentración de 2 µM, 8 µL de SYBR Green JumpStart™ Taq Ready Mix™ (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) y 6 µL de agua desionizada estéril. Los oligonucleótidos empleados para el análisis se encuentran en el APÉNDICE 1. El proceso de amplificación fue el siguiente: desnaturalización a 95°C por 3 min seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y finalmente, 1 min de alineamiento a 60°C. Los niveles de expresión fueron calculados automáticamente por el programa

Los niveles de expresión relativa se calcularon utilizando el parámetro $2^{-\Delta\Delta CT}$ donde:
 $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gen blanco} - CT \text{ promedio de los genes de referencia})_{\text{Tratamiento}} - (CT \text{ gen blanco} - CT \text{ promedio de los genes de referencia})_{\text{Control}}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

5.8 Generación de la construcción *p35S::Ah-2880-GUS*.

Para la obtención de la construcción del gen de función desconocida *Ah-2880* de amaranto, se diseñaron oligonucleótidos APÉNDICE 2) para amplificar la secuencia codificante completa a partir de ADNc de plantas de amaranto con un tamaño de 486pb. El producto de PCR obtenido, se purificó por el Kit Protocol (Qiagen, Hilden, Alemania) con las especificaciones del fabricante. Después, se digirió en los sitios reconocidos por las enzimas *Sma*I y *Xba*I, y subsiguientemente purificado por columnas de Invitrogen y posteriormente fue ligado dentro del vector binario pBI121 (Anexo A), utilizando la enzima T4 ADN Ligasa. Y adicionando en relación equimolar de inserto vector, durante 17 h a 16°C. Para finalizar la reacción, se incubó la mezcla a 65°C por 5 min.

Luego, se transformó utilizando células quimiocompetentes de *Escherichia coli* TOP10, incubándose 1 h a 37°C en medio LB; posteriormente, en placas en medio LB adicionado con Km (50 µg mL⁻¹) se colocó el cultivo durante 16 h a 37°C. Las transformantes positivas fueron seleccionadas y la extracción de plásmido se realizó mediante columnas Invitrogen. Después de un análisis de restricción, los fragmentos fueron secuenciados por los servicios genómicos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Mor., México). Al obtener el gen de interés, se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 mediante electroporación. Las células se incubaron durante 4 h a 28°C en 100 µL de medio LB. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó el cultivo en placas en medio LB adicionado con rifampicina (25 µg mL⁻¹) y carbenicilina (100 µg mL⁻¹) y se incubaron durante 48 h a 28°C.

5.9 Generación de la construcción *pAh-Hfr::GUS-GFP*.

Para la generación de la construcción de la región promotora del gen de amaranto *Ah-HFR* fusionada a los genes reporteros, se diseñaron los oligonucleótidos necesarios (APÉNDICE 2), para amplificar la región promotora de 892pb. Posteriormente, se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO TA Cloning® Kit vector (Invitrogen) (Anexo B); la secuencia de interés se transfirió al vector binario PFASTG04 (Anexo C) mediante recombinación homóloga con la tecnología del sistema GATEWAY, empleando la enzima Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen). El vector de expresión con el gen de interés se

introdujo a la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 mediante electroporación. Una vez transformadas las células se incubaron durante 2 h a 28°C en 250 mL de medio LB. Transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron en placas con medio LB adicionado con rifampicina (50 mg/ l) y espectinomicina (100 mg/ l) y se incubaron durante 48 h a 28°C.

VI. RESULTADOS

6.1 Secuencias transcriptómicas de interés.

Para los análisis de este trabajo fueron identificadas y seleccionadas ocho secuencias de interés a partir de un escrutinio realizado en la base de datos generada por la secuenciación del transcriptoma de *A. hypochondriacus*. Los nombres de las secuencias asociadas para los genes de función desconocida son *Hfr*, *DGR*, *ERD7*, *ZnFinger*, *DUF3407*, *2880*, *3844*, *3240*. La elección de las secuencias fue de acuerdo a su nivel de expresión bajo alguna de las cuatro condiciones de estrés además de ser confirmada la identidad de estas secuencias por alineamiento, a nivel de transcrito y de proteína, con las correspondientes *B. vulgaris* y *A. thaliana*, utilizando la herramienta BLAST. También se realizó un alineamiento en la base de datos del Blast4OneKp para conocer en que otras especies se encuentran, se utilizó el genoma del amaranto para determinar su región promotora, confirmar el codón de inicio y paro de la traducción de cada una de las secuencias. De las ocho secuencias 2 tuvieron dominios DUF, una presentó un dedo de zinc, otras un dominio de aglutinina y de senescencia, respectivamente, y 3 no presentaron dominios. Algunas tuvieron una identidad superior al 75% respecto a sus ortólogos en *B-vulgaris*, con excepción de los transcritos denominados *Hfr*, *ZnFinger*, *3844* y *3240*, cuya identidad fue inferior al 50%. Solo las secuencias de los transcritos *DGR*, *ERD7* y *DUF3407* tuvieron identidad en *A. thaliana*. Así mismo, algunas secuencias están presentes en plantas de la familia de Fabácea, Boraginaceae y Amaranthaceae principalmente. Todas las secuencias tienen sus regiones codificantes completas.

La expresión de los genes seleccionados, se validó mediante qRT-PCR. Previamente, se comprobó la eficiencia de amplificación para todos los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de los genes, que se encontraron en un rango entre 90-110% y

produjeron únicamente un producto de amplificación. Además, todos cumplieron las características de longitud de 19 a 23 pb, temperatura de alineamiento de alrededor de 60°, longitud de la región amplificada (100-180 pb), y la ausencia de estructuras secundarias.

6.2 Cambios en la expresión de los genes de interés en estrés biótico y abiótico.

El efecto del estrés por herbivoría, infección bacteriana y defoliación sobre la expresión de las secuencias de interés en plantas de *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, fue determinado en diferentes tejidos de la planta. Para herbivoría, fue determinado en la hoja dañada (respuesta local) y en las hojas distales intactas (respuesta sistémica). Sin embargo, para la infección bacteriana éstas se denominaron hoja dañada y hoja intacta, respectivamente, mientras que, para el experimento de defoliación, fue considerado sólo el conjunto de hojas dañadas, además del tallo y la raíz en cada uno de los tratamientos de estrés. Se evaluaron varios tiempos de muestreo: 6, 12, y 24 h. Para el caso de la defoliación, se analizaron cuatro etapas de desarrollo, que, como se indicó anteriormente, fueron denominadas como vegetativa 1 (V1), vegetativa 2 (V2), emergencia de panoja (EP) y floración (FL).

Los cambios en la expresión de los genes de función desconocida en plantas *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, expuestas al estrés salino, fue determinado en los tejidos de hoja, tallo y raíz, a los 4,7 y 9 días posteriores al inicio del estrés. Para la sequía, se consideró sólo a la especie *A. cruentus*, en diferentes grados de estrés y los tejidos analizados fueron las hojas y raíces.

Los niveles de expresión se estimaron utilizando el parámetro $2^{(-\Delta \Delta CT)}$, que indica la abundancia relativa de los transcritos. Éstos se analizaron entre especies y tejidos, a diferentes tiempos post tratamiento, o bien, en etapas definidas de desarrollo, tanto en plantas con estrés y plantas control. La abundancia relativa de los transcritos se normalizó a la unidad, de manera que los valores de abundancia relativa por encima de 1.5 fueron considerados como inducidos o sobre regulados y los valores menores a 0.5 como reprimidos o sub regulados.

Los resultados son mostrados en gráficos de “caja y bigotes” o “boxplots”, donde se graficaron los valores obtenidos en el análisis de cada uno de los experimentos independientes, con cuatro réplicas técnicas cada uno. Para mostrar las diferencias estadísticas de los tratamientos con respecto a las plantas control se realizó la comparación de medias, con la prueba de Tukey-Kramer, para representar significativamente las diferencias estadísticas y los límites de inducción (i. e. ≥ 1.5) o represión (i. e., ≤ 0.5). Dentro del grupo de genes estudiados, varios presentan niveles de inducción en múltiples condiciones de estrés. Enseguida se hace una descripción de los cambios más importantes en los niveles de expresión de los genes de función desconocida en respuesta a las múltiples condiciones de estrés, y en diferentes especies, tejidos y tiempos.

6.3 Cambios en la expresión de los genes de función desconocida en estrés biótico

6.3.1 Herbivoría

El estrés biótico ocasionó cambios en la expresión relativa de algunos genes de función desconocida, mismos que fueron dependientes de la especie, tejido analizado, duración del estrés y tipo de estrés. En la hoja dañada (respuesta local) se encontró un patrón de inducción relativamente constante para el gen *HFR*, ya que en *A. cruentus* se incrementó a un valor de expresión relativa de 92 a las 6 h, alcanzando su valor máximo de 462 a las 12 h y disminuyendo significativamente a las 24 h. Un patrón similar se observó en *A. hypochondriacus*, especie en la cual los niveles de expresión de este gen se incrementaron a las 6, 12 y 24 h. A su vez, *HFR* se indujo en *A. caudatus* a las 6 y 12 h, aunque se encontró reprimido a las 24 h (**Fig. 1A**). Por su parte, en la hoja intacta (respuesta sistémica), también aumentaron los niveles de expresión para *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* por encima del umbral de inducción a las 6 y 12 h, mientras que para *A. caudatus* los niveles se mantuvieron reprimidos (**Fig. 1B**). En tallo y raíz los niveles permanecieron cercanos a la unidad, con la excepción en tallo de *A. caudatus* a las 6 h (**Fig. 1C**) y raíz en *A. hypochondriacus* a 12 y 24 h, en donde se indujo ligeramente en tiempos tempranos (**Fig. 1D**). La expresión en hoja de *DGR* *A. cruentus* incrementó progresivamente en concordancia con la duración del estrés por herbivoría. En cambio,

en *A. hypochondriacus* no rebasó los límites de inducción o represión, mientras que en *A. caudatus* se indujo ligeramente a las 12 y 24 h (**Fig. 2A**). La respuesta sistémica de este gen en *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* no mostró cambios significativos, a excepción de las 24 h, donde se observó una ligera inducción en ambas especies. Sin embargo, la respuesta en *A. caudatus* fue mucho más rápida, intensa y duradera, induciéndose desde las 6 a las 24 a niveles de expresión similares (**Fig. 2B**). En tallo, destaca la expresión tardía de este gene en *A. cruentus* y *A. caudatus* y la falta de respuesta en *A. hypochondriacus*. (**Fig. 2C**). En raíz, fue evidente la represión de este gen en *A. caudatus* durante todo el experimento, mientras que, en las otras dos especies, la expresión fue baja y esporádica (**Fig. 2D**).

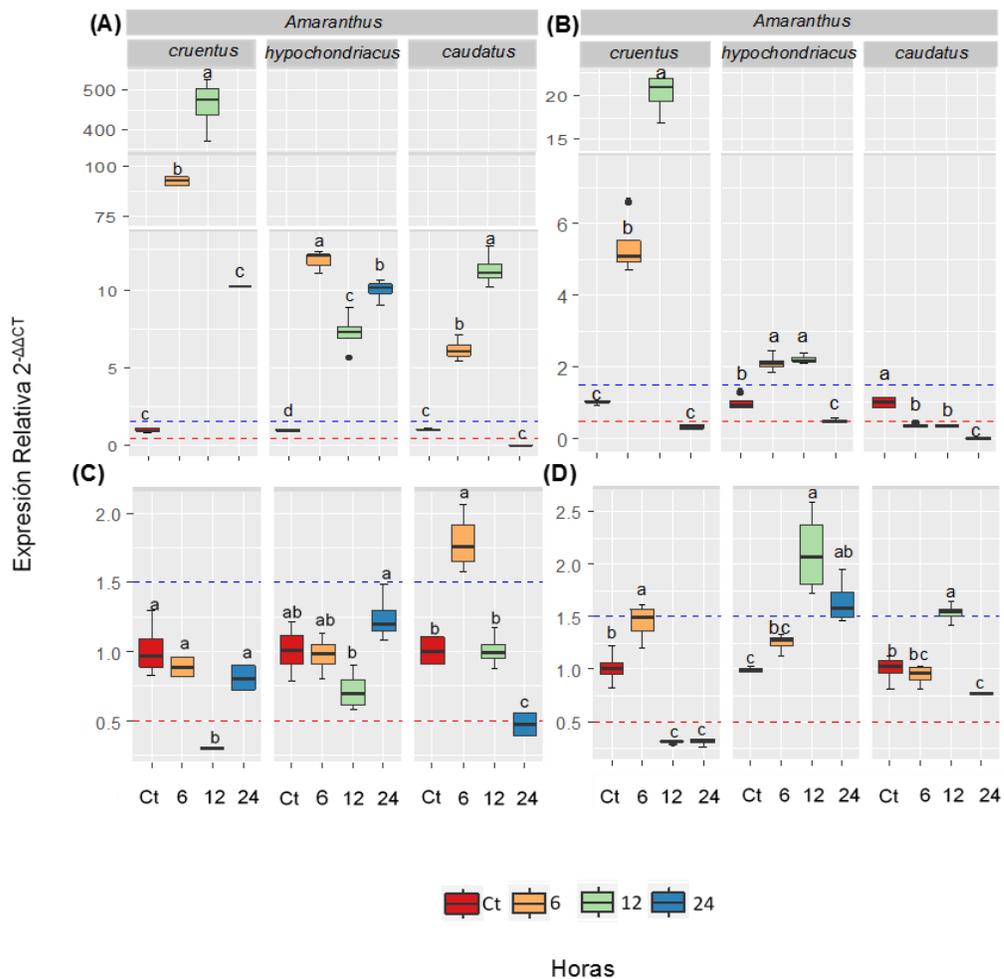


Figura 1. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *HFR* en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

La inducción del gen *3844*, en hoja dañada de *A. cruentus* sobresalió muy por encima de la observada en las dos otras especies, ya que mostró un gradual incremento de expresión de ca. 5 veces entre las 6 y 24 h de tratamiento. La expresión de este gen en las otras dos especies fue mínima. (**Fig. 3A**). La respuesta sistémica de este gen en *A. cruentus*, aunque inducida fue menor y se mantuvo sin cambios en *A. hypochondriacus*. Sin embargo, su expresión se reprimió claramente en *A. caudatus* a lo largo del tratamiento. (**Fig. 3B**).

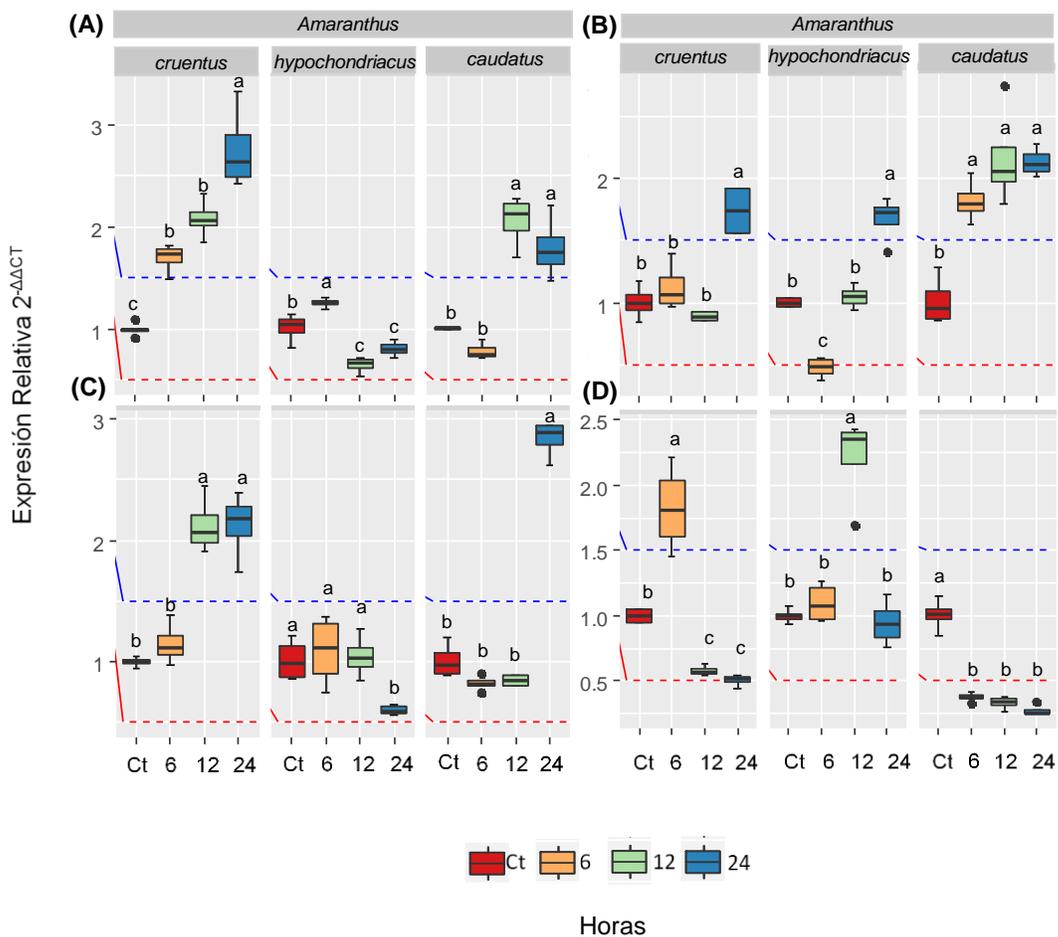


Figura 2. Expresión relativa del gen DGR en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen DGR en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

La inducción de este gen en tallo y raíz se mantuvo baja y esporádica en *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*. A su vez, permaneció reprimido en ciertos tejidos y tiempos en *A. caudatus*. (**Fig. 3C**). (**Fig. 3D**). Por otro lado, la expresión relativa del gen 3240 se indujo localmente, en forma temprana únicamente en hojas de *A. cruentus*. Asimismo, los niveles de expresión fueron disminuyendo con el tiempo, registrando su valor de expresión más bajo a las 24 h. En contraste, los niveles en las otras 2 especies apenas cambiaron, a excepción de una ligera inducción observada en *A. caudatus* a la 12 h (**Fig. 4A**). En hoja intacta, sólo destaca la inducción fuerte y tardía de este gen en *A. cruentus*, a las 24 h, aunque también se expresó débilmente en forma temprana en *A. hypochondriacus* a las 6 h. Por el contrario, no se detectó la inducción sistémica de este gen en *A. caudatus* (**Fig. 4B**). Se observó una inducción temprana de este gen, a las 6 h, en el tallo de plantas de *A. cruentus* y *A. caudatus* dañadas por herbivoría, aunque la magnitud de la respuesta fue mayor en la primera. Sin embargo, este gen tendió a reprimirse en después, sobre todo en *A. caudatus*, donde su expresión se reprimió a las 12 y 24 h después de iniciar el análisis. A su vez, la inducción de este gen en tallos de *A. hypochondriacus* fue tardía, observándose una débil inducción únicamente a las 24 h (**Fig. 4C**). En raíz, también se observó un contraste entre *A. hypochondriacus*, donde se indujo este gen a las 12 y 24 h, y las otras dos especies, donde se observó una represión a las 12 y 24 h de muestreo (i.e., en *A. cruentus*) o no se observaron cambios en los niveles de expresión (i. e., en *A. caudatus*) (**Fig. 4D**).

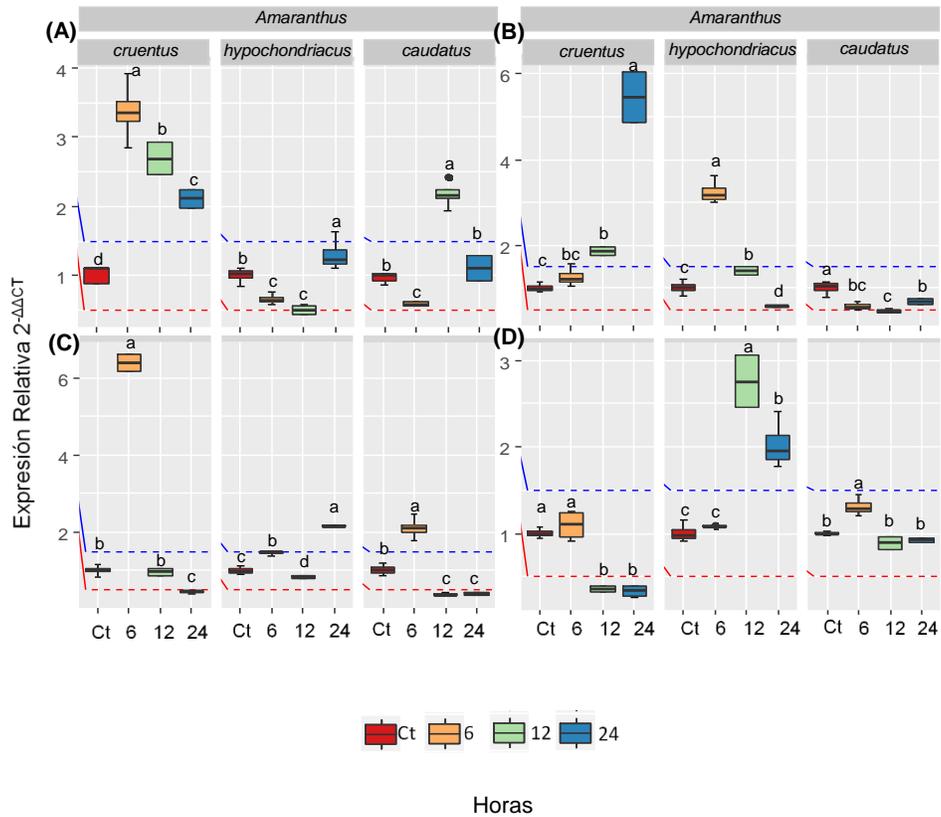


Figura 3. Expresión relativa del gen 3844 en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 3844 en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

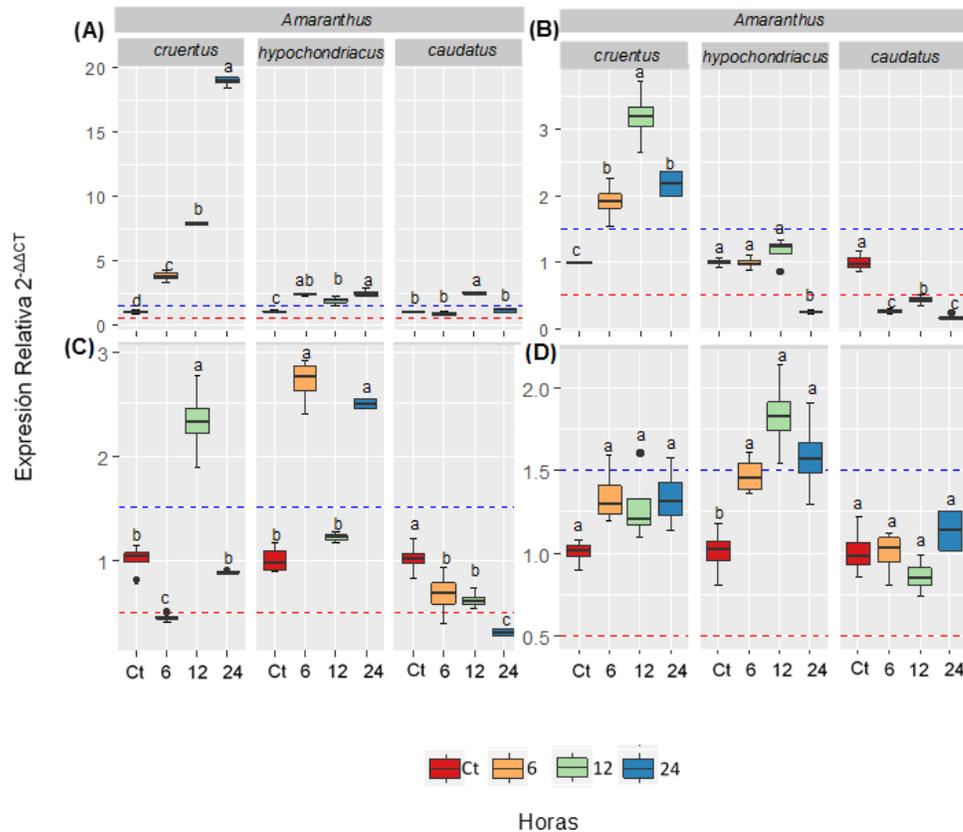


Figura 4. Expresión relativa del gen 3240 en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a estrés por herbivoría. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 3240 en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente

6.3.2 Infección bacteriana virulenta

Así también, fueron cuantificados los niveles de expresión de estos genes en respuesta al estrés causado por la infección bacteriana por *Cmm*, considerado un patógeno virulento en amaranto de grano. Al igual que en el ensayo de herbivoría, la expresión de *HFR* mostró variabilidad entre las especies, los tejidos y los tiempos de muestreo. La única inducción en hoja, tanto a nivel local como sistémico, se detectó tempranamente, a las 6 h post infección (pi), en *A. hypochondriacus*. En tiempos posteriores y en las otras dos especies, la respuesta de *HFR* a *Cmm* fue, en su mayoría negativa, sobre todo en *A. cruentus*, donde se reprimió casi en todos los tiempos de muestreo. (Fig. 5A, 5B). En el

tallo, se observó una fuerte inducción en *A. hypochondriacus* a las 12 h, la cual fue aproximadamente 19 veces mayor al control. Sin embargo, al igual que en hoja, la inducción de este gen se reprimió subsiguientemente a las 24 h de muestreo, y predominantemente en *A. cruentus*. En *A. caudatus*, el gen *HFR* se reprimió después de una débil inducción a las 6 h (**Fig. 5C**). El panorama cambió drásticamente en raíz, ya que el gen *HFR* no fue reprimido, sino que se indujo levemente en *A. hypochondriacus* a las 12h, en forma continua en *A. cruentus*, sobre todo a las 24 h e intensamente en *A. caudatus*, al mismo tiempo de muestreo. En este punto, el gen *HFR* incrementó su expresión hasta 45 x con respecto al control; luego, disminuyó a las 24 h hasta ca. 3.5 x más alto que los controles (**Fig. 5D**).

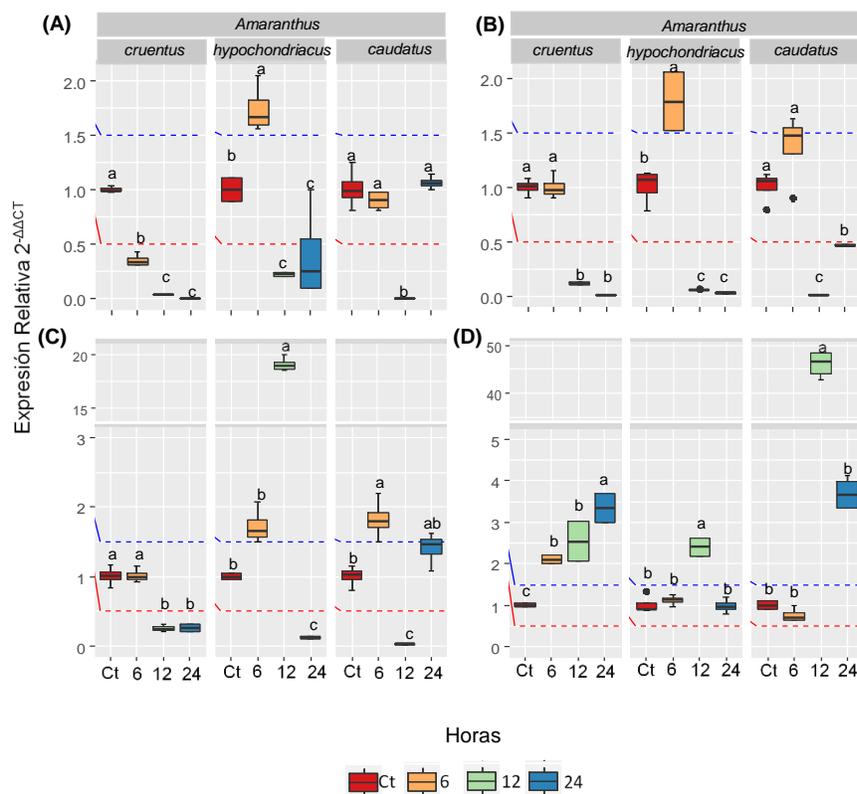


Figura 5. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana virulenta por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *HFR* en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

En cuanto al gen 2880, se observó una represión local y sistémica en hoja de *A. hypochondriacus* en la mayoría de los tiempos examinados, excepto a las 12 h, donde se produjo una débil respuesta local. La respuesta local en las otras dos especies también fue débil, contrastando con la represión observada a las 12 h en *A. caudatus*. Curiosamente, la respuesta sistémica alcanzó los mayores niveles de inducción en *A. caudatus* y *A. cruentus* a este mismo tiempo de muestreo. (**Fig. 6A, 6B**). La inducción de este gen en tallo y raíz fue mayor en *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, respectivamente, aunque sólo se presentó a las 12 h. Sin embargo, fue ca. 38 y 29 veces más alta que los controles, en cada caso. En *A. cruentus*, la inducción de este gen fue más débil y esporádica, observándose únicamente en tallo a las 12 h (Fig. 6C, 6D). Lo más sobresaliente para el caso del gen 3240, fue su inducción en todos los tiempos de muestreo en raíces de *A. hypochondriacus* (Fig. 7D). La respuesta en los otros tejidos fue una débil y esporádica inducción sistémica en hojas de *A. cruentus*, y en raíz de *A. cruentus* y *A. caudatus* (Fig. 7B, 7D). En todos los demás tejidos, la expresión del gen fue reprimida o permaneció neutra.

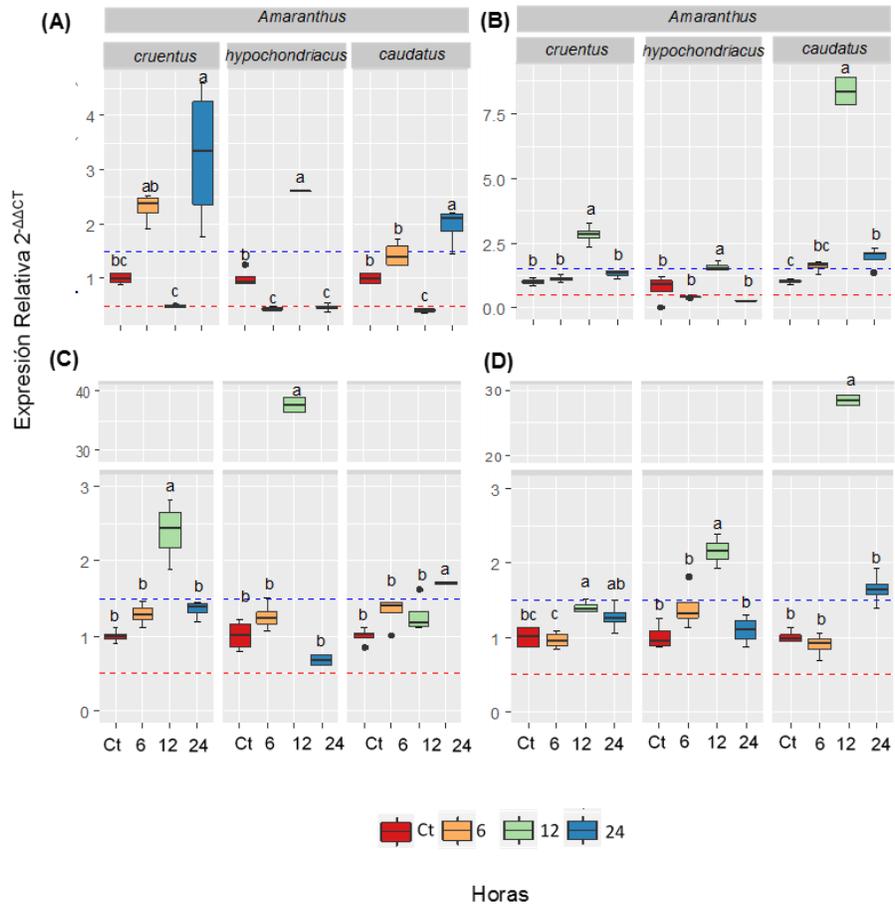


Figura 6. Expresión relativa del gen 2880 en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana virulenta por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Cmm). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 2880 en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6, 12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

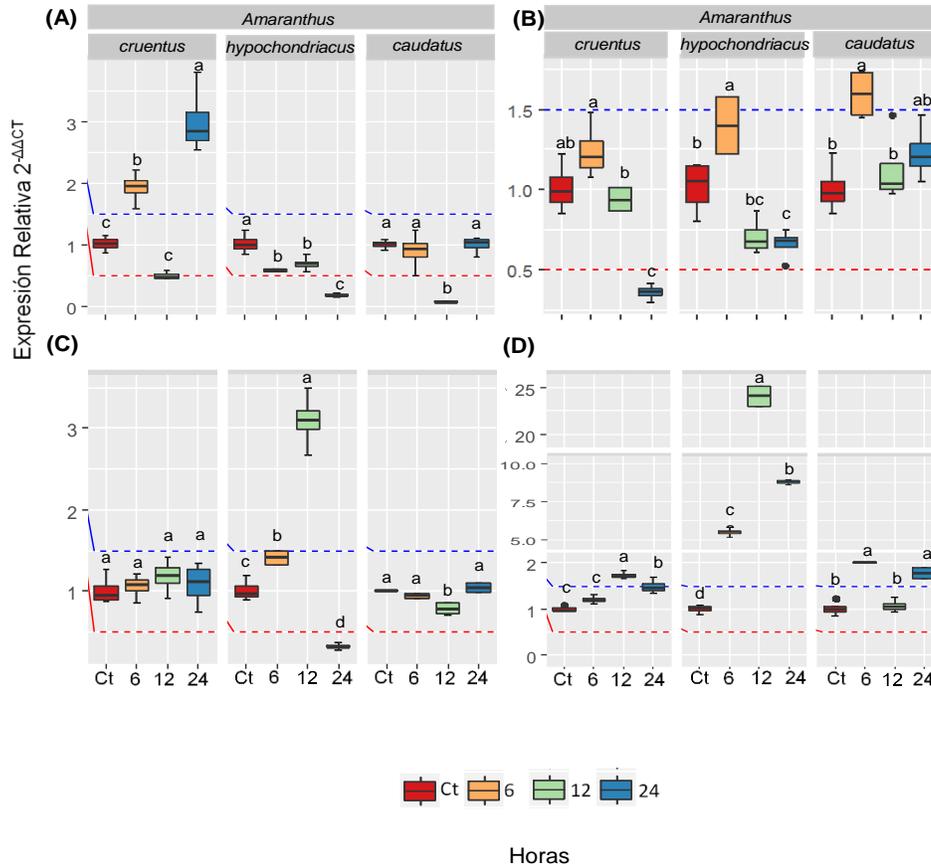


Figura 7. Expresión relativa del gen 3240 en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana virulenta por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Cmm). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 3240 en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6, 12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

6.3.3 Infección bacteriana avirulenta

Se observaron cambios en la expresión de estos genes en plantas infectadas con la bacteria avirulenta *Pss*. Entre los cambios más notables está la inducción casi constante de gen *HFR* en el tallo de plantas infectadas de las 3 especies, a las 12 hpi (Fig. 8d). El mayor incremento se observó en *A. caudatus*, donde el gen se indujo a valores ca 18 x más altos que los controles. Destaca, también, la extensiva represión en hojas, tanto a nivel local como sistémico, en todas las especies (Fig. 8A, 8B) y el contraste observado en raíces, donde este gen se indujo en todos los tiempos de muestreo en *A.*

hypochondriacus, mientras que se reprimió extensivamente en *A. cruentus* y *A. caudatus* (Fig. 8D)

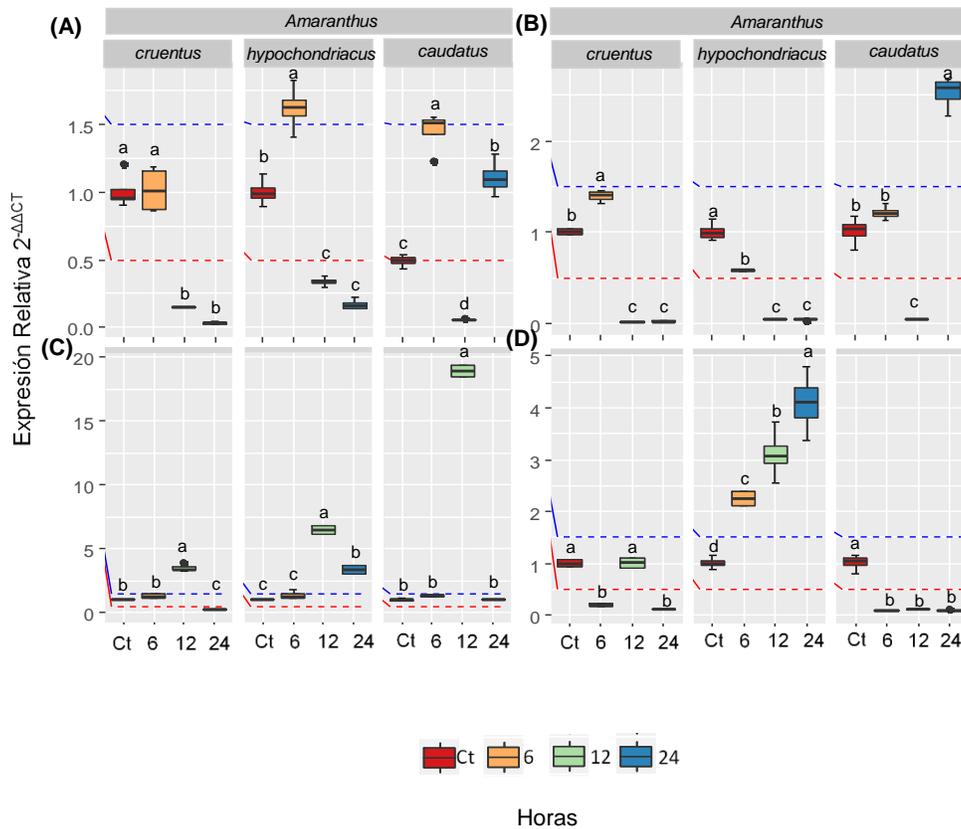


Figura 8. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *HFR* en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente

Los cambios en los niveles de expresión para el gen 2880 en la hoja local se indujeron en todas las especies, alcanzó el mayor valor de inducción de 7.30 en *A. cruentus* a las 12h (**Fig. 9A**). En hoja sistémica, para *A. cruentus* el gen indujo su expresión hasta 6.06 veces respecto el control; mismo que disminuyó en 24h a un valor de 2.5; sin embargo, en *A. hypochondriacus* alcanzó valores mayores en 12 y 24h

En cuanto al gen *2880*, sobresalen los siguientes efectos en respuesta a infección por *Pss*: (i) inducción de una respuesta local en hojas de todas las especies, y sistémica sólo en *A. caudatus*. Esta especie generó, además, las respuestas más intensas (Fig. 9A, 9B); (ii) inducción en tallo en todas las especies, sobre todo en *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, donde la inducción en tallo fue muy intensa, sobre todo en la última (i. e. ca. 61 x más alta que los controles) (Fig. 9C), y (iii) represión total de este gen en raíces de *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, en contraste con la débil inducción observada en *A. cruentus* a las 12 hpi (Fig. 9D).

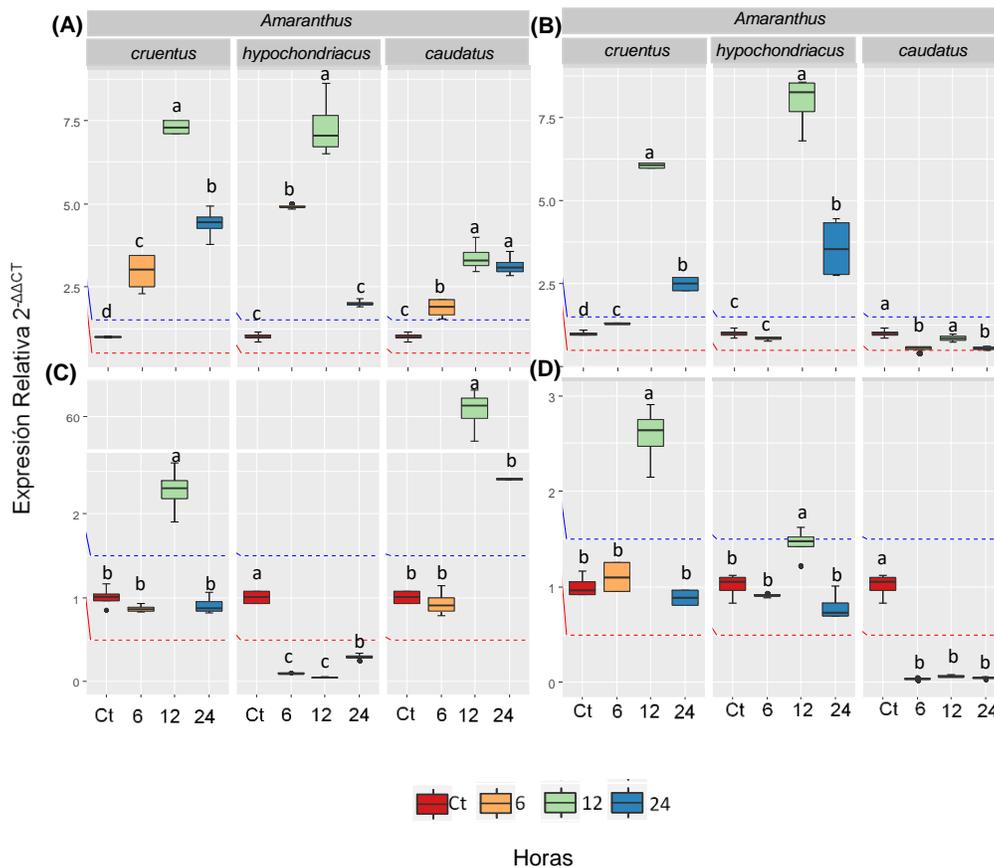


Figura 9. Expresión relativa del gen 2880 en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 2880 en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6, 12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

A su vez, el gen *ERD7*, tuvo un patrón de expresión similar en *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*. Resaltan la continua y gradualmente ascendente inducción local de

este gen en hojas de estas especies que llegó a alcanzar niveles de expresión ca. 60 x mayores a los controles (Fig.10A). En *A. caudatus*, la respuesta en hojas fue nula, excepto por la represión sistémica tardía observada a las 24 hpi (Fig. 10B). La respuesta en tallo también fue similar en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, donde se observó una débil inducción tardía a las 12 y 24 hpi, mientras que, en raíz, la expresión de este gen en esta especie casi no sufrió cambios. En cambio, en *A. caudatus*, el gen *ERD* no mostró cambios en tallo y se reprimió fuertemente en raíz (Fig. 10C, 10D).

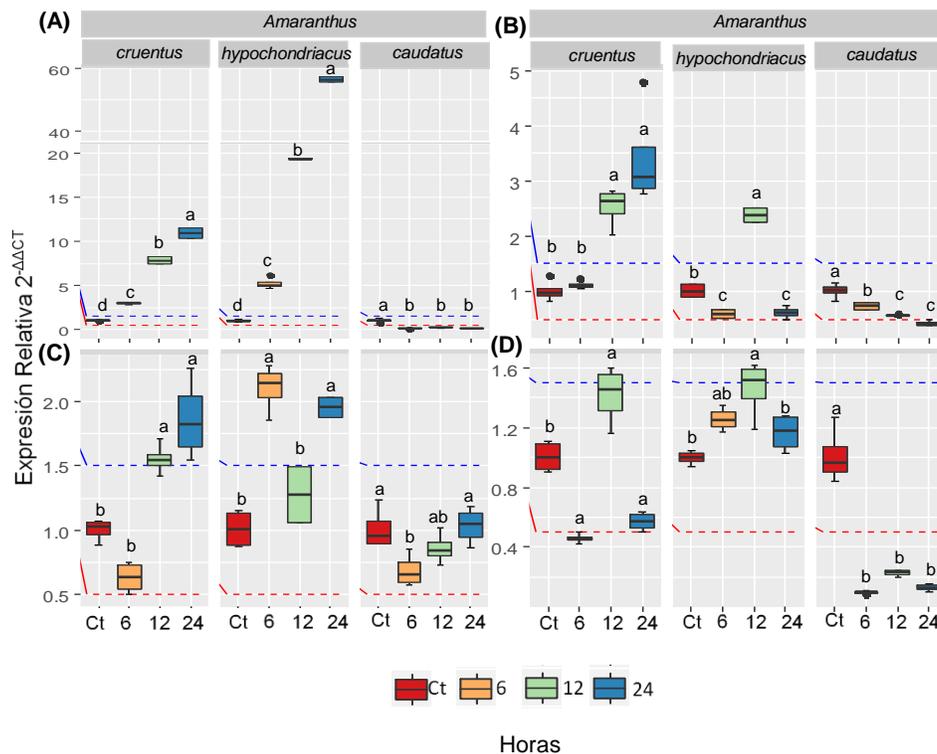


Figura 10. Expresión relativa del gen *ERD7* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *ERD7* en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

La expresión relativa del gen *DUF3407* en la hoja infectada (respuesta local). Sólo temporal y débil en *A. caudatus*, a las 6h, y constante durante todo el tiempo de muestreo y máxima a las 24 h en *A. hypochondriacus* (Fig. 11A), así como la expresión tardía de

este gen en tallo, también detectada a las 24 h (Fig. 11C), fueron las únicas respuestas de inducción observadas en respuesta a *Pss*. En todas las otras circunstancias la expresión de este gen no se vio alterada o fue reprimida, principalmente en la hoja distal no infectada (respuesta sistémica) de todas las especies (Fig. 11B) y, uniformemente, en la raíz de *A. caudatus* (Fig. 11D).

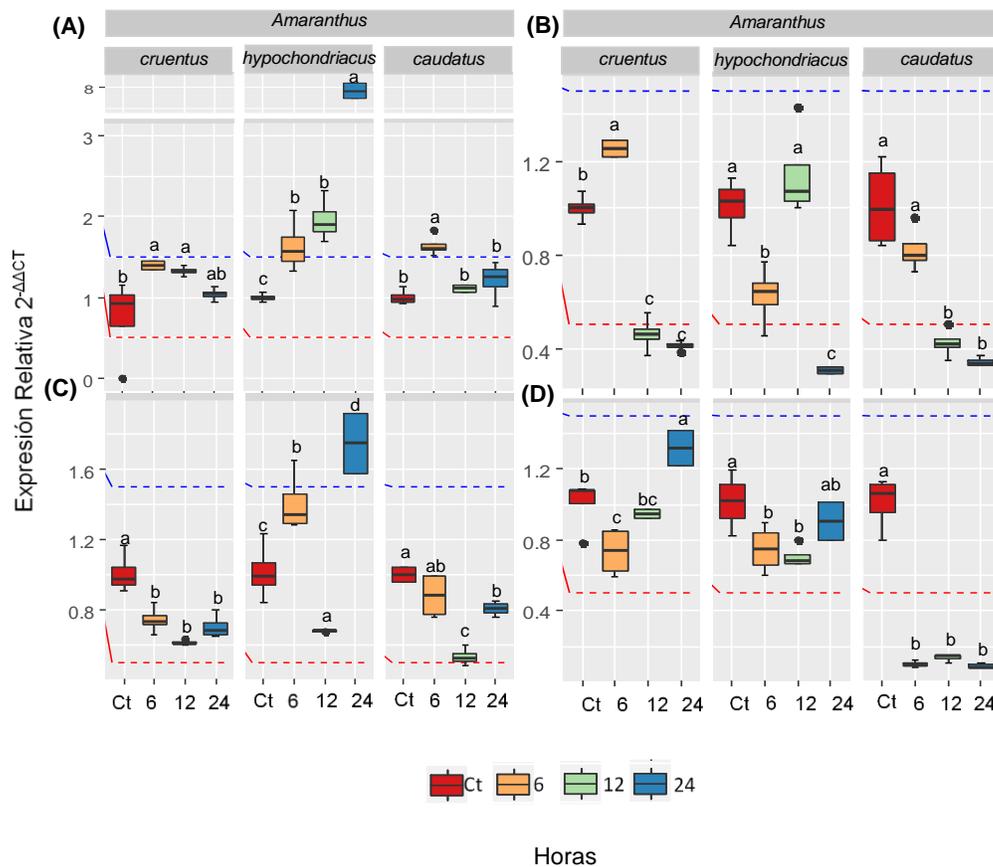


Figura 11. Expresión relativa del gen *DUF3407* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *DUF3407* en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

La expresión relativa del gen *DGR* en hoja infectada (respuesta local) y distal (respuesta sistémica), fue temprana, induciéndose sólo a las 6 h dpi, y de intensidad débil a

moderada, en *A. hypochondriacus* (Fig. 12A, 12B). Un efecto idéntico se observó en tallo y raíz de esta especie (Fig. 12C, 12D). A su vez, en *A. caudatus*, la inducción local y sistémica en hojas se extendió hasta las 12 h dpi, mientras que en *A. cruentus* sólo se indujo a las 12 h dpi. En ésta última, la respuesta local se vio posteriormente reprimida a las 24 h dpi (Fig. 12A, 12B). La inducción de este gen en tallo de estas dos especies también se retrasó hasta las 12 h dpi (Fig. 12C), mientras que se observaron cambios de expresión en raíz (Fig. 12 D).

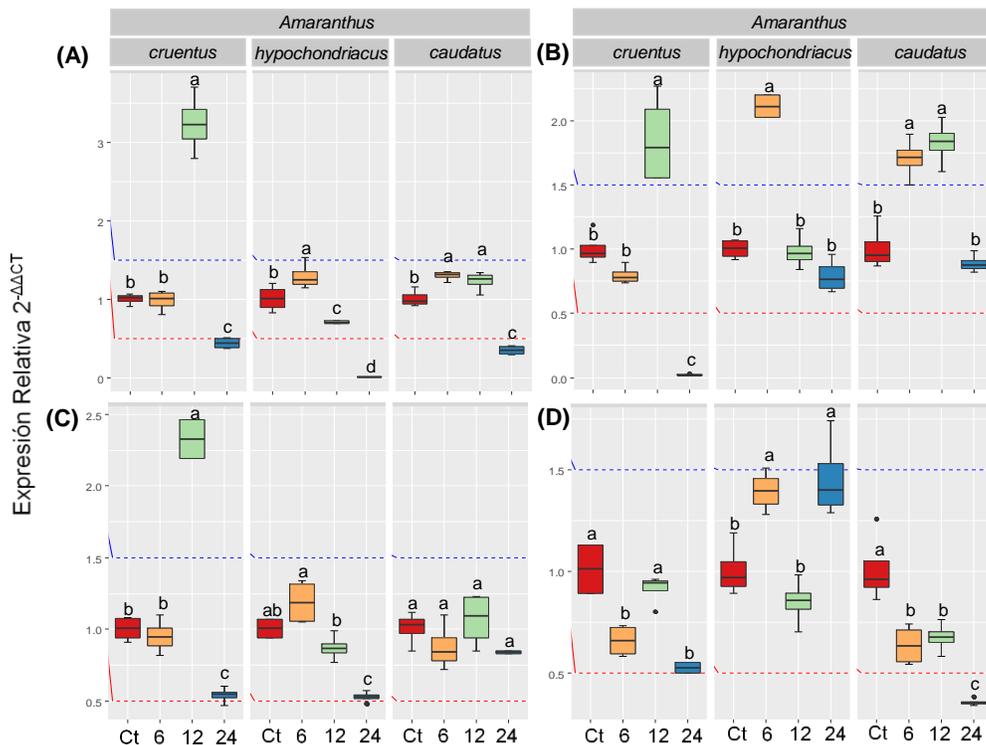


Figura 12. Expresión relativa del gen *DGR* en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *DGR* en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

El gen 3844 en hoja local mostró inducción en las tres especies. Esta fue más clara en *A. hypochondriacus*, especie en la cual se indujo en todos los tiempos de muestreo, alcanzando un punto máximo a las 12 h con un valor de expresión ca. 9 x más alto que los controles. En las otras dos especies, la inducción local de este gen se mantuvo hasta las 12 h dpi, en *A. caudatus*, mientras que en *A. cruentus* fue más tardía, apareciendo hasta las 12 h dpi y permaneciendo así hasta las 24 h dpi. (Fig. 13A). Sin embargo, este gen también se indujo en forma sistémica en esta última especie, mientras que la las otras dos permaneció sin cambio o fue reprimido (Fig. 13B). La inducción de este gen en tallo de *A. hypochondriacus* también destacó por estar presente durante todo el tiempo de muestreo, mientras que en las otras dos especies su inducción fue más esporádica (Fig. 13C). En raíz, el efecto de la infección por *Pss* fue completamente dependiente de la especie: inducido débil y tardíamente en *A. hypochondriacus*, sin cambios en *A. cruentus*, y completamente reprimido en *A. caudatus* (Fig. 13 D).

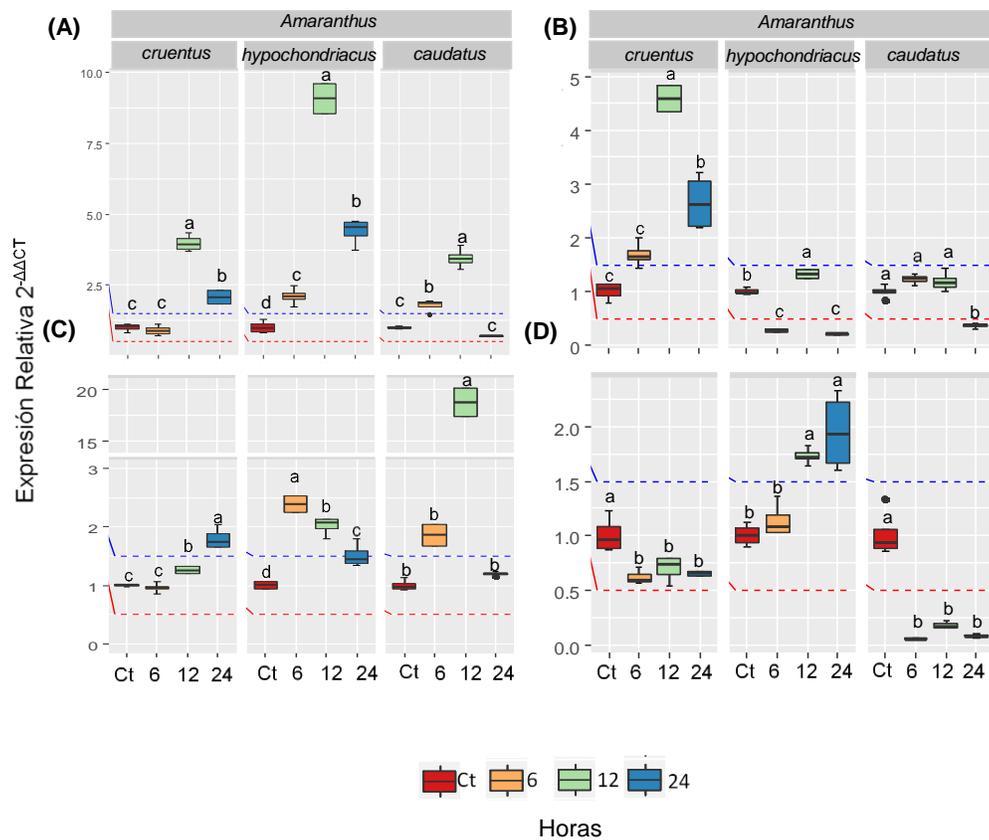


Figura 13. Expresión relativa del gen 3844 en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 3844 en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6,12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

El gen 3240 se indujo, tanto en forma local como sistémica, en hojas de *A. hypochondriacus*, aunque ésta última sólo se indujo débil y temporalmente a las 12 h dpi, en comparación con la respuesta local que se mantuvo hasta las 24 h dpi. A su vez, *A. cruentus* y *A. caudatus* difirieron por la falta de inducción de este gen a nivel local y sistémico, respectivamente. En ambos casos la inducción fue temprana y desapareció a las 24 h dpi (Fig. 14A). En tallo, la inducción de este gen fue muy puntual, detectándose sólo a tiempos tardíos en *A. hypochondriacus* (i. e., 24 h dpi), intermedios en *A. caudatus* (i.e., 12 h dpi) e intermedios y tardíos en *A. cruentus* (12 y 24 h dpi). Los niveles más altos de detectaron en tallos de *A. caudatus* (Fig. 14C). Mientras tanto, la expresión de

ese gen en raíz en respuesta a *Pss* volvió a depender de la especie, ya que se indujo sólo temporalmente en *A. hypochondriacus* (i. e., a las 12 h dpi), permaneció sin cambios en *A. cruentus* y fue totalmente reprimido en *A. caudatus* (Fig. 14 D). Es de resaltar que todos los genes incluidos en este estudio, excepto DGR, se reprimieron por el estrés aplicado en raíces de *A. caudatus*, independientemente de su origen.

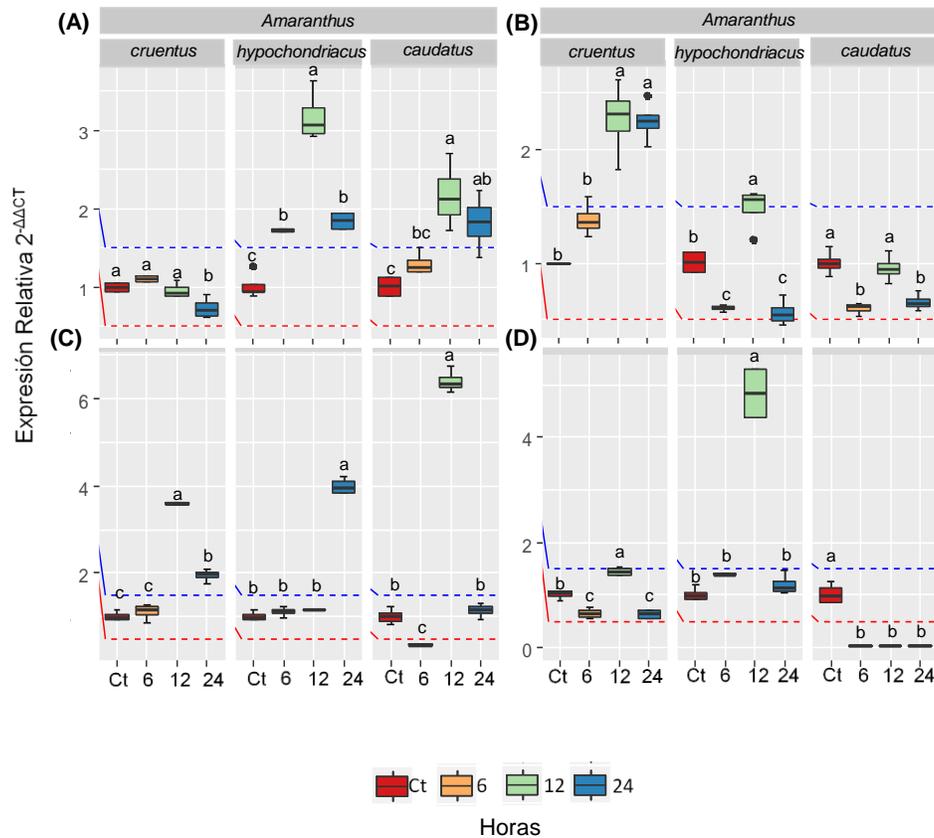


Figura 14. Expresión relativa del gen 3240 en hoja dañada, hoja intacta, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a infección bacteriana avirulenta por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*). Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 3240 en (A) hoja dañada, (B) hoja intacta, (C) tallo y (D) raíz, medida en relación al control (Ct), y a diferentes tiempos (6, 12 y 24 h) horas después del inicio del estrés. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

6.3.4. Defoliación mecánica

La expresión en hoja defoliada del gen *DGR* incrementó con la etapa de desarrollo de la planta, manteniéndose apenas encima del umbral mínimo de inducción en las etapas V1 y V2 para luego incrementar sus niveles ca. de 13 x por encima de los controles en la etapa EP. Sin embargo, los niveles decayeron a valores similares a los registrados en V1 y V2 durante FL (Fig. 15). El patrón de expresión de los genes *ZnFinger* y *HFR* en la hoja de plantas defoliadas fue idéntico al mostrado por el gen *DGR*, excepto que los niveles de expresión fueron mayores y se incrementaron gradualmente entre las etapas V1 y EP (Fig. 16 y 18). La expresión de los genes *Zn Finger* y *HFR* en la etapa EP fue ca. 25 x y 15 x mayores a la registrada en los controles, mientras que en FL se detectaron los valores de expresión más bajos. Un comportamiento similar al gen *DGR* también se observó para el gen *DUF3407*, excepto que este gen no se indujo por encima de los controles durante FL (**Fig. 17**).

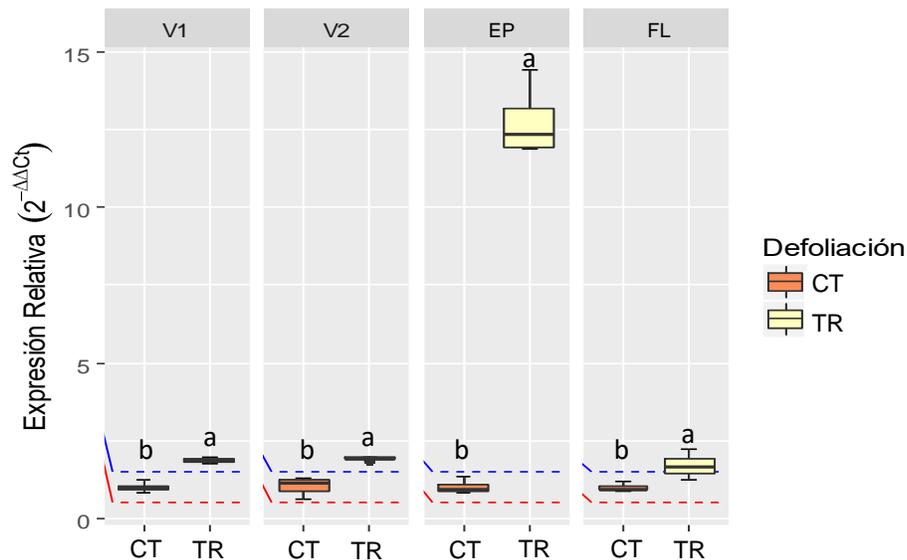


Figura 15. Expresión relativa del gen *DGR* en hojas de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación severa. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *DGR* en hoja defoliada (pérdida del 67% de su área foliar), medida en diferentes etapas de desarrollo: vegetativa 1 (V1), vegetativa 2 (V2), emergencia de panoja (EP), y floración (FL). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

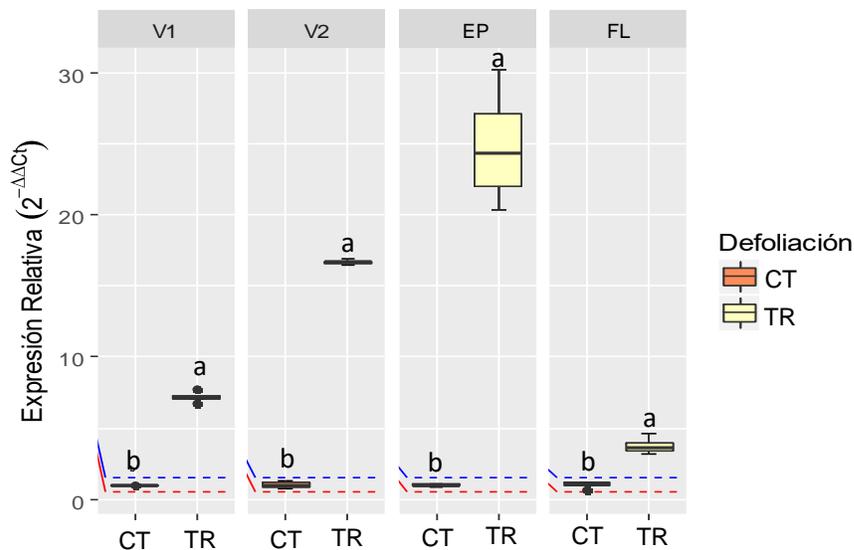


Figura 16. Expresión relativa del gen *Zn Finger* en hojas de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación severa. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *Zn Finger* en hoja defoliada (pérdida del 67% de su área foliar), medida en diferentes etapas de desarrollo: vegetativa 1 (V1), vegetativa 2 (V2), emergencia de panoja (EP), y floración (FL). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

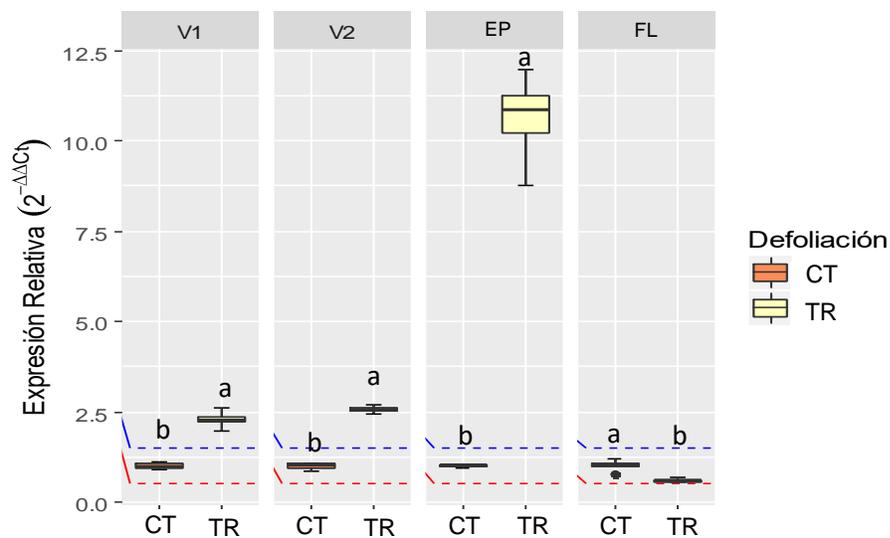


Figura 17. Expresión relativa del gen *DUF3407* en hojas de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación severa. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *DUF3407* en hoja defoliada (pérdida del 67% de su área foliar), medida en diferentes etapas de desarrollo: vegetativa 1 (V1), vegetativa 2 (V2), emergencia de panoja (EP), y floración (FL). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

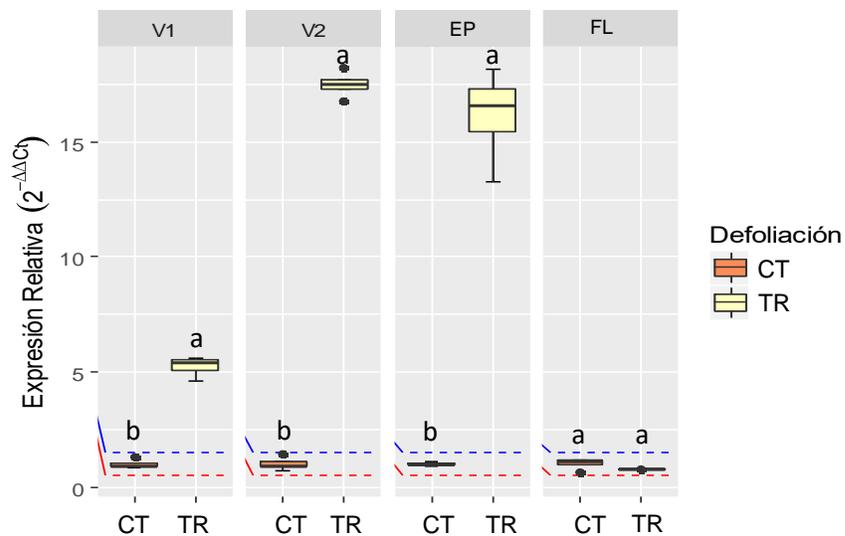


Figura 18. Expresión relativa del gen *HFR* en hojas de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación severa. *Box-plots* de la abundancia de transcritos del gen *HFR* en hoja defoliada (pérdida del 67% de su área foliar), medida en diferentes etapas de desarrollo: vegetativa 1 (V1), vegetativa 2 (V2), emergencia de panoja (EP), y floración (FL). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

6.4 Cambios en la expresión de los genes de función desconocida en estrés abiótico.

El estrés abiótico ocasionó cambios en la expresión relativa de algunos genes de función desconocida, mismos que, similar a lo observado en respuestas a estrés biótico, fueron dependientes de la especie, tejido, duración del estrés y tipo de estrés. La expresión del gen *HFR* tendió a expresarse principalmente en tallo (Fig. 19B) y a reprimirse casi en su totalidad en hojas (Fig. 19A). Las respuestas en tallo y raíz fueron muy débiles y aisladas en *A. hypochondriacus*, aunque destaca la fuerte inducción de este gen en raíz (ca. 76 × mayor a los controles) a los 9 días después de tratamiento (ddt) (Fig. 19C). Este patrón contrastó con *A. cruentus* y *A. caudatus*, donde se registraron respuestas intensas y constantes en estos órganos, especialmente en ésta última. Para el gen *ERD7* sobresalen su alta y constante inducción en tallo de *A. caudatus* (Fig. 20B) y hoja de *A. hypochondriacus* Fig. 20A). También destacan los altos niveles de expresión detectados en hoja de *A. cruentus* a los 4 ddt y la constante represión de este gen en hojas de *A.*

caudatus (Fig. 20A). En forma similar, es relevante la tendencia general a la represión de este gen en raíz (Fig. 20C), excepto por la eventual inducción débil en *A. hypochondriacus*, a los 9 ddt. El gen *Zn Finger* fue prácticamente reprimido en hoja durante la duración del experimento en todas las especies (Fig. 21A). Mostró una débil inducción en tallos de *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* a los 7 ddt (Fig. 21B), mientras que fue inducido fuertemente en raíces de *A. caudatus* (Fig. 21C), sobre todo a los 7 ddt (ca. 120 x superior a los controles) a diferencia de la esporádica inducción observada en las otras dos especies.

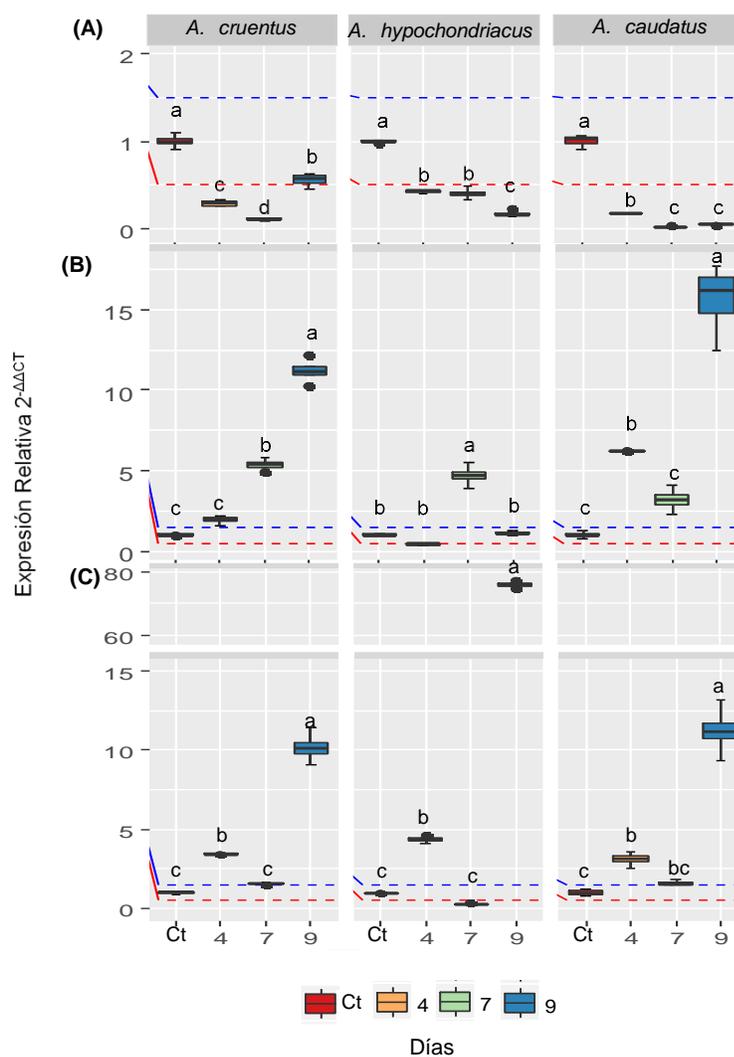


Figura 19. Expresión relativa del gen *HFR* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *HFR* en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

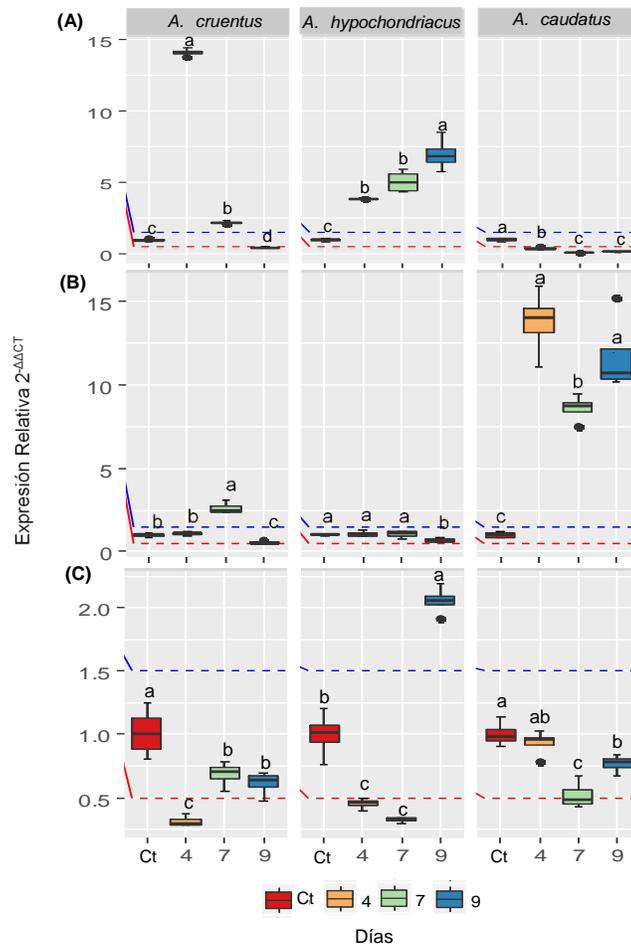


Figura 20. Expresión relativa del gen *ERD7* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *ERD7* en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

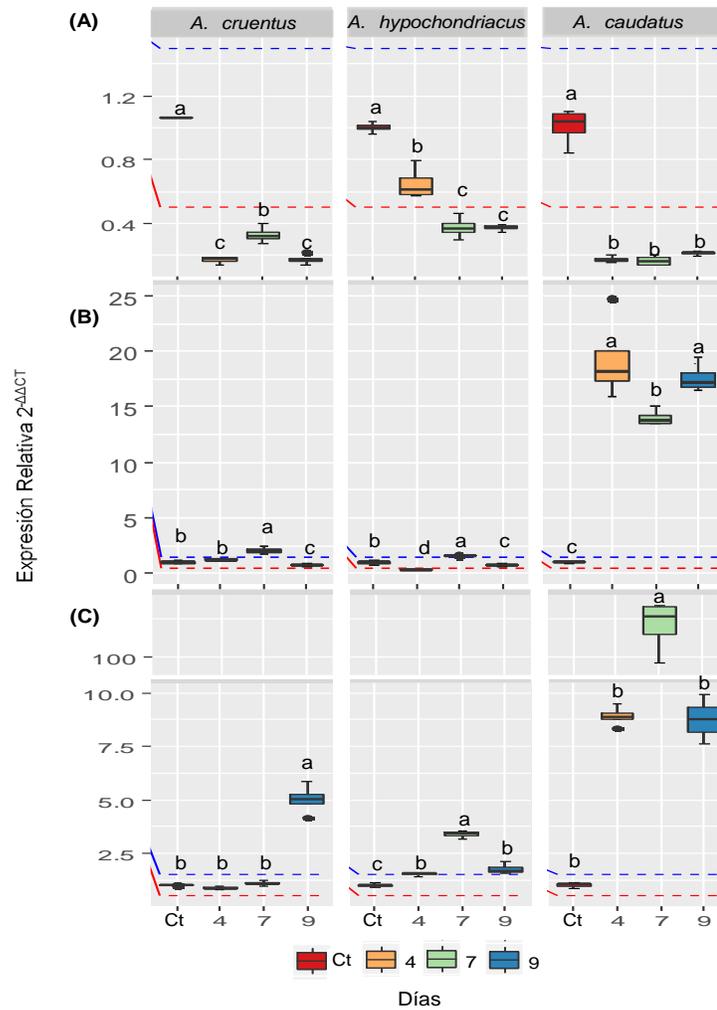


Figura 21. Expresión relativa del gen *Zn Finger* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *Zn Finger* en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

Excepto por una débil inducción del gen *DGR* a los 9 ddt, se observó una represión total este gen en hojas de en las tres especies (**Fig. 22A**). La expresión de este gen en tallo y raíz, ausente en *A. hypochondriacus* e inducida aisladamente en *A. cruentus*, mostró niveles de inducción fuertes y constantes a lo largo del tratamiento en *A. caudatus*, sobre todo en raíz a los 7 ddt (ca. 35 x más altos que los controles) (Fig. 22B, 22C).

Los cambios en la abundancia relativa del gen *DUF3407* en respuesta a alta salinidad ocurrieron principalmente en *A. caudatus*, especie en la cual se observó una represión completa en la hoja (Fig. 23 A), que contrastó con la inducción a niveles medianos a altos en tallo (23B). En contraste, este gen permaneció sin cambios en la raíz de las tres especies (Fig. 23C).

Se detectó una expresión alta de este gen a los 7 ddt, de ca. 35 x mayor a los controles (Fig. 23B, 23C). A su vez, la expresión de este gen en raíz de *A. cruentus* fue un evento aislado, ya que sólo se observó una leve inducción a los 7 ddt (Fig. 23C).

El gen *3240* se indujo sobre todo en tallos y raíces de *A. cruentus* y *A. caudatus*, y en tiempos tardíos del tratamiento. Los efectos más intensos se detectaron en *A. caudatus*, donde la expresión de este gen en tallos y raíz alcanzó ca. 18 x y 14 x niveles más altos que los controles a los 7 ddt (Fig. 24B, 24C). Sin embargo, la expresión más fuerte en raíz se detectó aisladamente en *A. hypochondriacus* a los 7 ddt, tiempo en que los niveles de expresión fueron ca. 100 x más altos que los controles (Fig. 23C), mientras que la expresión de este gen en hoja sólo se detectó en *A. cruentus*, sobre todo a tiempos tempranos, i.e., 4 ddt, tiempo en el cual alcanzó niveles de acumulación de transcritos ca. 14 x más altos que los controles (Fig. 24A).

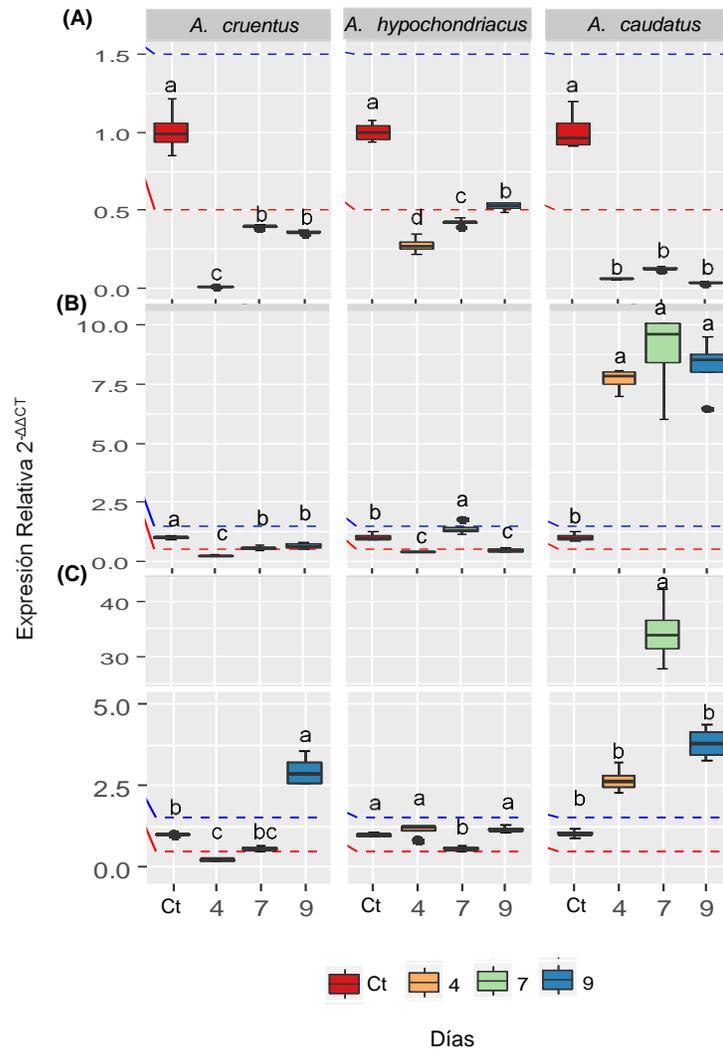


Figura 22. Expresión relativa del gen *DGR* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. *Box-plots* de la abundancia de transcritos del gen *DGR* en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

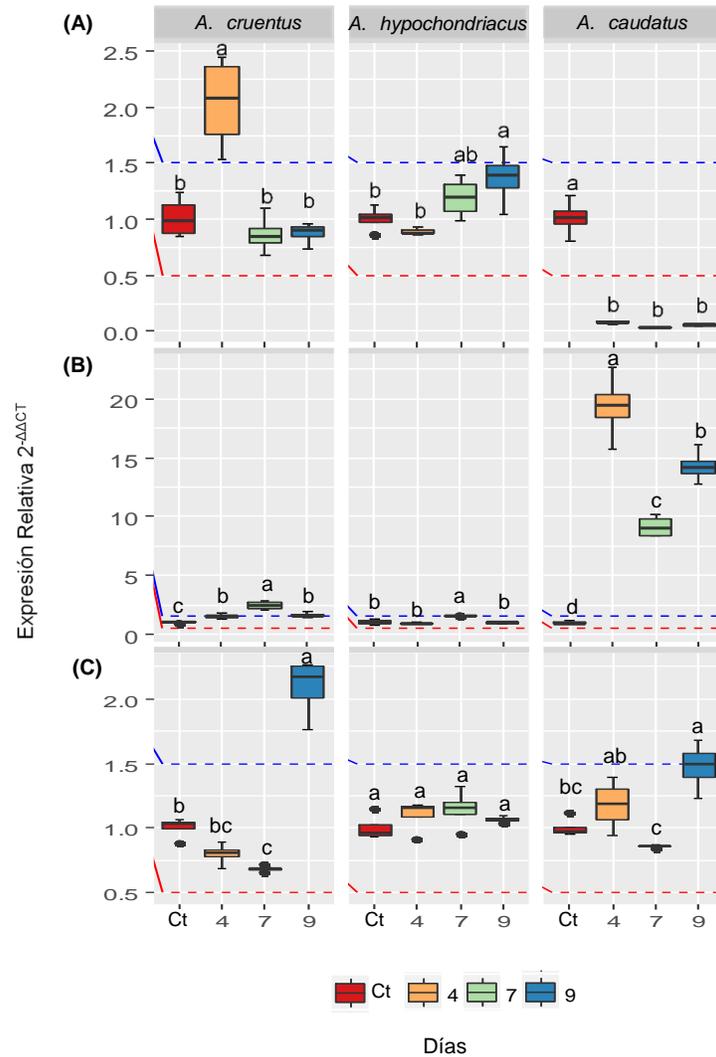


Figura 23. Expresión relativa del gen *DUF 3407* en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen *DUF 3407* en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

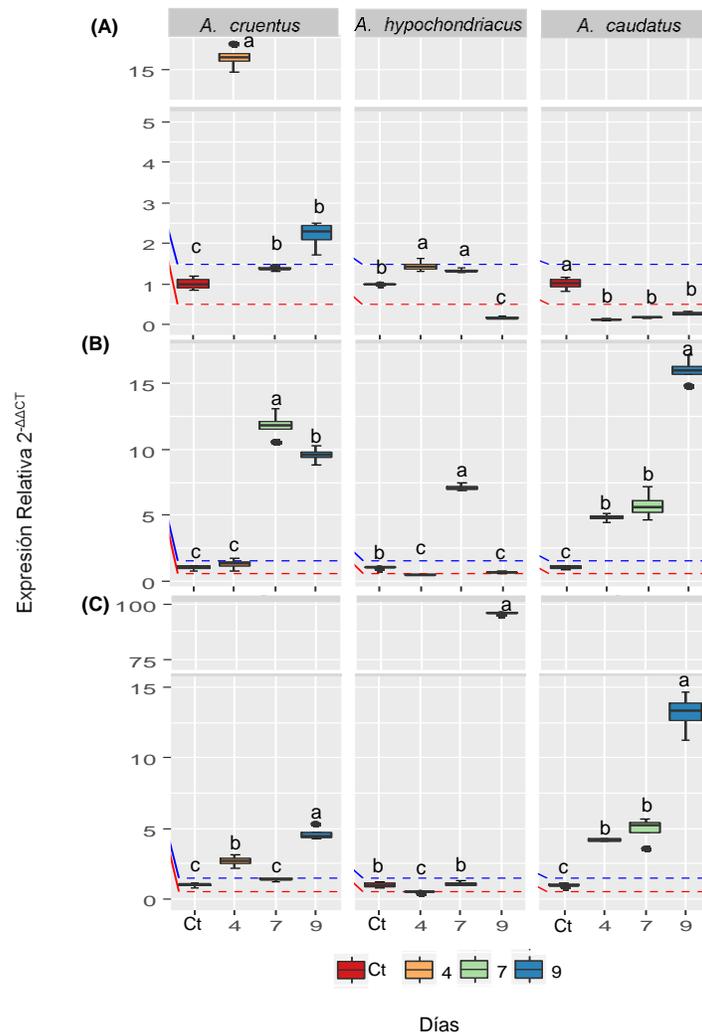


Figura 24. Expresión relativa del gen 3240 en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. *Box-plots* de la abundancia de transcritos del gen 3240 en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

La expresión del gen 3844 en respuesta a alta salinidad mostró ser, también, dependiente de la especie, ya que se indujo en forma ascendente en *A. hypochondriacus*, alcanzando niveles de expresión ca. 13 × más altos que los controles los 9 ddt, permaneció sin cambios en *A. cruentus* y se reprimió totalmente en *A. caudatus* (Fig. 25A). En contraste, la inducción de este gen en tallo y raíz en respuesta a alta salinidad fue casi constante y de mediana intensidad en esta última especie, mientras que en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, la expresión del gen 3844 fue débil y esporádica (Fig. 25B, 25C). Finalmente,

los cambios de expresión del gen 2880 en respuesta a alta salinidad se presentaron casi exclusivamente en *A. caudatus*, donde esta condición de estrés reprimió uniformemente la expresión de este gen en hoja (Fig. 26A), mientras que en tallo y raíz ocurrió todo lo contrario, ya que la expresión fue constante, llegando a valores de expresión máximos en ambos órganos a los 9 ddt (Fig. 26B, 26C). A su vez, este estrés indujo la expresión de este gen en hoja, tardía y débil en *A. hypochondriacus* (i.e., a los 9 ddt) y temprana e intensa en *A. cruentus* (i.e., a los 4 ddt). En estas especies también se observó una represión temprana del gen, a los 4 y 7 ddt, seguida de una fuerte inducción a los 9 ddt, en raíces de *A. hypochondriacus*, y una débil y tardía inducción, a los 9 ddt, en tallo y raíz de *A. cruentus* (Fig. 26B, 26C).

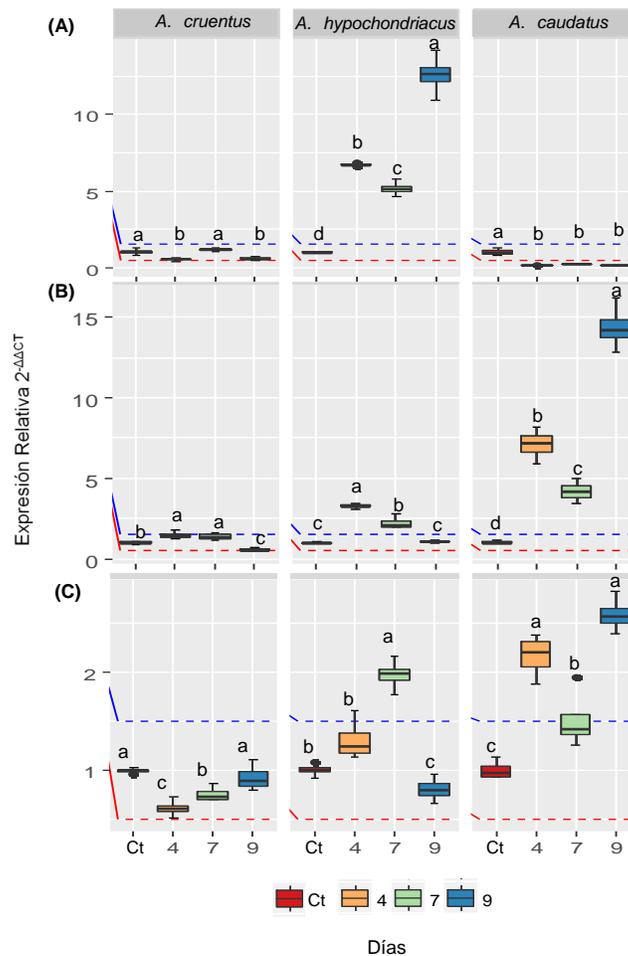


Figura 25. Expresión relativa del gen 3844 en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 3844 en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

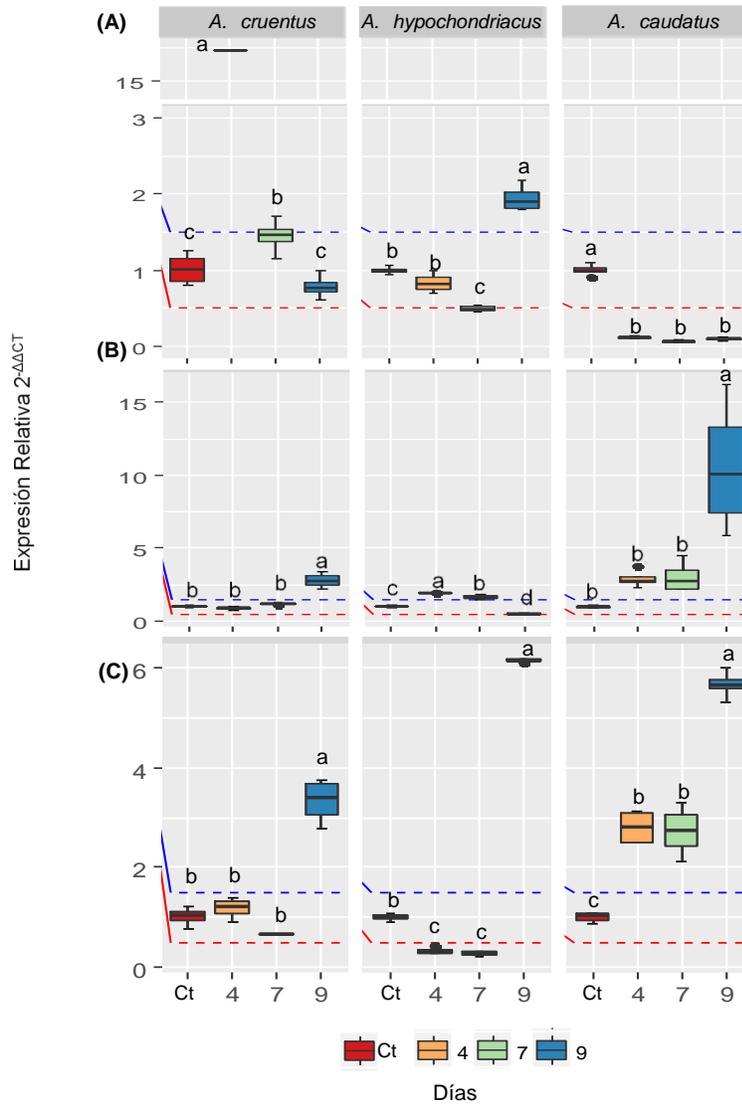


Figura 26. Expresión relativa del gen 2880 en hoja, tallo y raíz de distintas especies de amaranto, sometidas a alta salinidad. Box-plots de la abundancia de transcritos del gen 2880 en (A) hoja, (B) tallo y (C) raíz, medido en los días control (Ct), cuatro, siete y nueve días posteriores al estrés (4, 7 y 9 d). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey–Kramer. Las distintas letras representan diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 4$). Las líneas punteadas en azul y rojo representan los límites arriba o debajo de los cuales este gen se indujo o reprimió por el estrés aplicado, respectivamente.

VII. DISCUSIÓN

El amaranto de grano es una planta que posee características agronómicas deseables; además, se ha observado que presenta una tolerancia sobresaliente a diferentes condiciones de estrés (Huerta *et al.*, 2009). Estudios anteriores han mostrado que el amaranto de grano tiene una mayor tolerancia a la deficiencia de agua en comparación con plantas como maíz, trigo y sorgo (Espitia Rangel *et al.*, 2012). Otro trabajo, reportó que existe una mayor tolerancia a la salinidad en las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, ya que en el experimento toleraron una concentración de 200 mM de cloruro de sodio (NaCl). En este estudio se sugirió que esta propiedad se debe a que las hojas son más gruesas y tienen una menor apertura estomatal (Omami *et al.*, 2006). Además, se ha visto que es sumamente tolerante a la herbivoría. Aunque hay poca información acerca de las bases bioquímicas y/ o moleculares de esta tolerancia, se han reportado diversas respuestas de defensa a insectos herbívoros y, también, por efecto de la aplicación exógena de jasmonatos (Délano Frier *et al.*, 2004). De igual forma, en experimentos realizados en campo, se ha observado que la defoliación mecánica de *A. hypochondriacus* incrementa la producción de la semilla (Martínez Moreno *et al.*, 1999) y que plantas de *A. cruentus* mostraron una significativa tolerancia a la defoliación severa (Vargas-Ortiz *et al.*, 2013).

En un estudio previo en la cual se evaluaron las respuestas en amaranto de grano a infecciones producidas por patógenos bacterianos, se encontró que existe una diferencia altamente dependiente de la especie; por ejemplo *A. cruentus* fue más resistente que *A. hypochondriacus* (Casarrubias-Castillo *et al.*, 2014). Desde un enfoque filogenético *A. hybridus* mostró ser muy diverso genéticamente y se considera que es el ancestro común de las especies de grano. Al parecer, dentro de las especies de amaranto de grano, *A. caudatus* y *A. hypochondriacus* están más estrechamente relacionados entre sí en comparación con *A. cruentus* (Kietlinski *et al.*, 2013).

En un análisis transcriptómico realizado en amaranto de grano, se encontraron genes expresados diferencialmente en respuesta a varias condiciones adversas; algunos se indujeron en más de una condición de estrés, incluyendo genes de función desconocida (Délano-Frier *et al.*, 2011). Sobre la base de esta información, en este estudio se enfocó

en el análisis de ocho genes de función desconocida (i. e., *HFR*, *2880*, *ERD7*, *Zn Finger*, *3844*, *3240*, *DUF3407* y *DGR*), que mostraron patrones de expresión significativos en diferentes tejidos, especies de amaranto, etapas de desarrollo y condiciones de estrés. Estos resultados sugieren que los genes estudiados podrían participar de alguna manera, en la regulación de respuestas o mecanismos novedosos capaces de otorgar una mayor tolerancia ante el estrés.

7.1 Gen *HFR*

El producto proteico del gen *HFR* presenta ortólogos en trigo y amaranto. Anteriormente, se ha reportado que participa en procesos de regulación positiva en respuesta a estrés biótico y abiótico. Entre los estímulos que se ha encontrado que activan su expresión están la herbivoría por insectos masticadores y chupadores, infección por patógenos, infestación por nemátodos, la sequía, el frío y altas concentraciones de sal, respectivamente (Van Damme *et al.*, 2008). También, se ha propuesto que desempeñan un papel en la defensa contra atacantes de plantas expresándose principalmente en tejidos como hojas, raíces y flores. Además, se ha visto que las plantas pueden utilizarlas como proteínas de reserva para el crecimiento y desarrollo (Vandenborre *et al.*, 2011). En un estudio con plantas de trigo sometidas a estrés por herbivoría, se observó un aumento significativo en la expresión de esta proteína (Puthoff *et al.*, 2005). Investigaciones recientes sugieren que la actividad de HFR puede deberse a un dominio aglutinina que tiene la capacidad de realizar una reacción antígeno-anticuerpo con alguna proteína o metabolito del herbívoro. En nuestro estudio, las tres especies de amaranto de grano (*A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus*) incrementaron significativamente los niveles de expresión del gen *HFR* aumentaron en respuesta al herbívoro *Trichoplusia ni*. La respuesta fue intensa, principalmente en *A. cruentus*, cuya expresión relativa fue hasta 462 veces más alta que los controles en la hoja dañada, o respuesta local (Fig.1A). A nivel sistémico también hubo un efecto significativo, aunque su expresión se reprimió en *A. caudatus* (Fig. 1B). La defoliación severa en amaranto de grano de la especie *A. cruentus* se correlacionó con el efecto causado por herbivoría, en parte porque la inducción del gen *HFR* indujo su expresión gradualmente durante las etapas vegetativas (1 y 2) y en EP. Sin embargo, interesantemente al llegar la etapa de

floración disminuyó su expresión, a valores muy cercanos a la unidad o al límite de represión (Fig. 18). En forma similar, la expresión relativa del gen *HFR* en las tres especies de amaranto de grano bajo estrés salino aumentó significativamente en tallo y la raíz. Un efecto interesante observado en el tallo de *A. cruentus*, fue que el incremento fue gradual hasta los nueve días; en cambio, en *A. hypochondriacus* hubo una inducción del gen a niveles constantes durante la duración del experimento. Estos resultados pueden sugerir que *HFR* no está involucrado en procesos de recuperación por estrés salino en esta especie. Por otro lado, en *A. caudatus*, el máximo nivel de expresión ocurrió hasta los nueve días, pudiendo sugerir que en esta especie el mecanismo de recuperación en el que está involucrado *HFR* es tardío ya que se ha visto que esta especie tiende a activar su maquinaria primeramente en respuesta a estrés por sequía y posteriormente a estrés salino (Fig.19C). Al evaluar la raíz, para la misma condición de estrés, se observó que en los primeros siete días no fue detectada una inducción marcada: Sin embargo, en el día nueve, la expresión fue mayor. La misma tendencia se presentó en las tres especies. De algún modo esta era la respuesta no era la esperada, considerando que la respuesta al estrés salino en raíz es una función conservada en plantas, y que debe activarse rápidamente, ya que es el órgano expuesto directamente al estrés desde su inicio (Fig.19D).

En la infección con patógenos bacterianos, la resistencia en la planta puede presentarse de manera local o distal (Summermatter *et al.*, 1995). En nuestro estudio, las plantas de las tres especies también fueron expuestas a infección por *Pss*. Se detectaron niveles de *HFR* por encima del umbral de expresión principalmente en la raíz de *A. hypochondriacus*, a diferencia de las en las otras 2 especies, donde este gen fue reprimido (Fig. 12D). Aunque se esperaba que existiera una mayor expresión en la hoja infectada, los datos sugieren que existe una posible respuesta en la raíz que involucra a este gen, pero desconocemos la función contra *Pss* que pudiera tener en este órgano. Como se reportó en un trabajo realizado por Baysal *et al.*, 2003, *Cmm* es un patógeno que amenaza constantemente a los cultivos de tomate, principalmente en invernadero, causando infecciones vasculares, marchitez, clorosis, y con frecuencia, la muerte. En este trabajo se analizó si alguno de los genes de función desconocida elegidos, incluido el *HFR*, podía estar involucrado en la defensa este tipo estrés. Al igual que *Pss* los

cambios en los niveles de expresión también se dieron básicamente en raíz, pero en este caso en *A. cruentus*; mientras los otros tejidos no mostraron modificaciones (Fig.5D).

7.2 Gen *DGR*

La proteína *DGR* pertenece a la familia DUF642 altamente conservada de plantas y probablemente está involucrada en procesos de desarrollo (Zúñiga & Gamboa de Buen, 2012). Las proteínas pertenecientes a esta familia incluida *DGR*, presentan un dominio altamente conservado al que aún no se le ha asignado una función. Sin embargo, en análisis comparativos a nivel de secuencias proteicas se ha visto que tiene una gran similitud con proteínas que contienen motivos de unión a galactosa. Algo que caracteriza a las proteínas pertenecientes a esta familia es un péptido señal en la región N-terminal que puede sugerir una posible localización en el sistema endo membranal o en la pared celular (Zúñiga & Gamboa de Buen, 2012). Un estudio reciente mostró que la sobreexpresión de *Ah-DGR2* en *Arabidopsis* provoca hipersensibilidad a ABA, NaCl y altera la estructura de la pared celular (Palmeros-Suárez *et al.*, 2016).

En este trabajo se sometieron plantas de amaranto de grano a condiciones de estrés salino para evaluar un posible papel del gen *DGR* y se encontró que se induce en tallo y raíz de la especie *A. caudatus* principalmente. Cuando este gen se evaluó en estrés por herbivoría, se observó que la respuesta local en hojas de *A. cruentus* mostró una tendencia a incrementar gradualmente con el tiempo de estrés. De igual forma, la respuesta sistémica se indujo en plantas de *A. caudatus*. Estos datos sugieren que *A. caudatus* y *A. cruentus* presentan una respuesta temprana de este gen ante la herbivoría. Como era de esperarse, el gen *DGR* presentó un mayor nivel de expresión a nivel local. Además, en la defoliación mecánica, se observó una inducción intensa de este gen durante la etapa EP en *A. cruentus* (Fig. 15). En la infección por *Pss*, se observó que a las 12 h el nivel de expresión fue mayor en la hoja local, hoja sistémica y tallo para la especie *A. cruentus*, mientras que *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* presentaron un patrón similar de expresión a las 6 h en hoja sistémica. Estas diferencias en la expresión entre especies dan un posible indicio acerca del mecanismo que desencadena el patógeno, siendo *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* capaces de responder en zonas

cercanas a la infección y en *A. cruentus* el gen *DGR* se induce tardíamente pero en la zona afectada.

La expresión relativa del gen *DGR* en plantas infectadas por *Cmm*, no mostró valores tan altos en las distintas especies. Posiblemente no se vieron niveles altos de expresión porque no está directamente involucrado en la respuesta a un patógeno como *C. michiganensis*. Estos resultados coinciden con otros reportes que muestran la inducción de genes pertenecientes a la familia DUF642 cuando plantas de *Arabidopsis* eran sometidos a estrés por patógenos, como *P. syringae* (Kreps *et al.*, 2002).

7.3 Gen *DUF3407*

El gen *DUF3407* pertenece a la familia de genes de función desconocida. La proteína predicha por la región codificante del gen tiene una masa molecular de 42 kDa. En *A. thaliana* se ha encontrado un ortólogo que codifica para una proteína de unión a cobalto, el cual puede estar involucrado en el transporte de este metal, a través de la membrana celular. Este gen fue elegido para medir los niveles de expresión principalmente en estrés salino ya que es posible que esté actuando como un transportador de metales como el sodio y cobalto. Los resultados mostraron que el gen *DUF3407* incrementa sus niveles de expresión en el tallo, particularmente en la especie *A. caudatus* y se correlaciona con la idea de que el tallo es una de las estructuras involucradas en el transporte de sales durante el estrés.

Cuando el gen fue evaluado en plantas de amaranto expuestas a un herbívoro, los niveles de expresión se mantuvieron por debajo del umbral o cercanos a la unidad en las diferentes especies de amaranto. Con esto se deduce que el gen no está involucrado en la respuesta al herbívoro. En contraste, en la defoliación por daño mecánico se incrementaron los valores de expresión de este gen en la etapa vegetativa (1 y 2), mientras que su expresión se presentó mayormente en la emergencia de panoja disminuyendo subsiguientemente en la etapa de floración (Fig. 17). Durante el estrés causado por *Pss*, se observó la inducción de la respuesta local en *A. hypochondriacus*, la cual se mantuvo a medida que transcurrieron las horas de estrés. Esto puede sugerir que la planta tiende a inducir el gen en el tejido infectado, aunque lo realiza mediante un mecanismo gradual que va en incremento. Contrariamente, los niveles de expresión de

este gen en plantas infectadas por *Cmm* se mantuvieron por debajo del umbral de expresión, en los diferentes tejidos y especies de amaranto, lo que sugiere que es inhibido por este patógeno durante su proceso de infección.

7.4 Gen *ERD7*

El producto del gen *ERD7* presente en amaranto de grano tiene una masa molecular de 24 kDa y se encuentra un ortólogo en *A. thaliana* predicho para funcionar en la respuesta temprana ante la deshidratación. Reportes previos muestran que este gen respondió a la acumulación de ABA cuando plantas de *A. thaliana* fueron sometidas a estrés por deshidratación y los máximos niveles de expresión de este ortólogo se alcanzaron después de 10 h de estrés (Kiyosue *et al.*, 1994). En este trabajo, se encontró que el gen *ERD7* se induce significativamente en condiciones de estrés salino en hoja de *A. hypochondriacus* y también en el tallo de *A. caudatus* (Fig. 20). Sin embargo, este gen se indujo gradualmente a través del tiempo en la hoja local de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* en respuesta a la infección por *Pss*, hasta alcanzar altos valores en *A. hypochondriacus* a las 24 h dpi. Por lo tanto, se sugiere que este gen podría tener un papel de tolerancia al estrés biótico o abiótico.

7.5 Gen *Zn Finger*

El producto del gen *Zn Finger* tiene una masa molecular de 30 kDa y no se encontró un ortólogo en *A. thaliana*. El motivo dedos de zinc se encuentra formado por cuatro cisteínas que coordinan átomos de zinc. Este motivo lo presentan proteínas que tienen unión a DNA como algunos factores de transcripción y enzimas remodeladoras de la cromatina, entre otras (Altschul *et al.*, 2006). De igual manera, este gen indujo sus niveles de expresión en respuesta a la defoliación a lo largo del desarrollo, incrementándose mayormente en la etapa EP (Fig. 16). Además, en estrés salino el gen se indujo mayormente en el tallo y la raíz de *A. caudatus*. Por lo que este gen también podría contribuir en la tolerancia o resistencia ante el estrés biótico o abiótico.

7.6 Genes 2880, 3240 y 3844.

Existen otros genes sin homología en otras especies pero que producen proteínas que pueden ser novedosas y que aún no se ha determinado su función en amaranto. Estos genes podrían revelar mecanismos, quizás novedosos, asociados al estrés biótico y abiótico, que confieren una ventaja en la adaptación de las plantas que lo tienen. Por ejemplo, el gen 2880 con una masa molecular predicha de 18.4 kDa indujo su expresión en la hoja local de todas las especies expuestas a la infección por *Pss*. Se observó que sus niveles de expresión también se incrementaron en respuesta a alta salinidad, pero principalmente en tallo y raíz de *A. caudatus*. El gen 3240 con una masa molecular predicha de 11.2 kDa se mostró inducido en las condiciones de herbivoría principalmente en la hoja local de la especie *A. cruentus* (Fig.4). Durante la salinidad, también mostró cambios, mayormente en la hoja de *A. cruentus* y el tallo y la raíz de *A. caudatus* (Fig.24), mientras que en la infección virulenta con *Cmm*, sólo se observó inducción en la raíz de *A. hypochondriacus* (Fig. 7) y en la infección avirulenta por *Pss* se presentó en la hoja local de la especie de *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, mientras que la respuesta sistémica se indujo únicamente en *A. cruentus* (Fig. 14). Y, por último, el gen 3844 con una masa molecular predicha 13.5 kDa, se indujo significativamente en forma local y sistémica de la especie de *A. cruentus* al ser sometidas a estrés por herbivoría (Fig.3). En la infección por *Pss*, el gen se indujo en la hoja local para las tres especies y a nivel de respuesta sistémica, solo se mostró este aumento en *A. cruentus* (Fig. 13). Este gen se indujo en respuesta a alta salinidad principalmente en la hoja de *A. hypochondriacus* y el tallo de *A. caudatus* (Fig.25).

VIII. CONCLUSIONES

- La expresión relativa de los genes estudiados varió dependiendo de la especie y del tratamiento, tejido y etapa de desarrollo.
- Las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* presentaron un patrón de expresión similar, diferente al de *A. caudatus*.
- El gen *Ah-HFR* podría tener una función en la defensa común contra insectos masticadores y chupadores, además de patógenos. También podría estar involucrado en la resistencia de amaranto a alta salinidad.
- *Ah-ERD7* podría estar involucrado en la tolerancia al estrés abiótico (salinidad), en tallo y raíz.
- El gen *Ah-ZnFinger* podría estar involucrado en la defensa al estrés por defoliación severa.
- Los genes *Ah-2880*, *Ah-3844*, *Ah-3240*, son genes huérfanos, que podrían revelar mecanismos novedosos de tolerancia al estrés biótico y abiótico.

IX. PERSPECTIVAS

- ❖ Seleccionar las líneas homocigotas para la fusión *pAh-Hfr::GUS-GFP* y *p35S::Ah-2880-GUS* en plantas de *A. thaliana*.
- ❖ Determinar el sitio de expresión de la fusión *pAh-Hfr::GUS-GFP* en condiciones de estrés biótico y abiótico en plantas de *A. thaliana*.
- ❖ Determinar la localización de la fusión *p35S::Ah-2880-GUS* en condiciones de estrés biótico y abiótico en plantas de *A. thaliana*.
- ❖ Obtener sobreexpresantes del gen *Ah-2880* en plantas de *A. thaliana* y la tolerancia al estrés biótico y abiótico en estas plantas.
- ❖ Estudiar el comportamiento que presenta la región promotora *Ah-Hfr* a los diferentes tipos de estrés.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, I., de Vos, R.C.H., Bones, A.M. & Hall, R.D. 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci.* **15**: 664–674.
- Akhtar, M., Jaiswal, A., Taj, G., Jaiswal, J.P., Qureshi, M.I. & Singh, N.K. 2012. DREB1 / CBF transcription factors : their structure , function and role in abiotic stress tolerance in plants. *Indian Acad. Sci.* **91**: 385–395.
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Schäffer, A.A. & Yu, Y. 2006. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* **272**: 5101–5109.
- Arendsee, Z.W., Ling, L. & Wurtele, E.S. 2014. Coming of age : orphan genes in plants. *Trends Plant Sci.* **19**: 698–708. Elsevier Ltd.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A. & Chan, R.L. 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci.* **12**: 419–426.
- Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Adv.* **27**: 84–93. Elsevier Inc.
- Bailey, S.J. & Voeselek, L.A.C.. 2008. Flooding stress : acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 313–339.
- Barba de la Rosa, A., Silva Sánchez, C. & González de Mejía, E. 2007. Amaranth : An Ancient Crop for Modern Technology. *Am. Chem. Soc.* **946**: 103–116.
- Bartels, D. & Sunkar, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **24**: 23–58.
- Baysal, Ö., Soyulu, E.M. & Soyulu, S. 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp . *michiganensis*. *Plant Pathol.* **52**: 747–753.
- Belton, P. & Taylor, J.R.N. 2002. Pseudocereals and less common cereals. *Springer* **18**: 270.
- Bennett, R.N. & Wallsgrave, R.M. 1994. Tansley Review No . 72 Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **127**: 617–633.
- Bhatnagar Mathur, P., Vadez, V. & Sharma, K.K. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants : Retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* **27**: 411–424.
- Bidkar, A.P., Thakur, K.K., Bolshette, N.B., Dutta, J. & Gogoi, R. 2014. In-silico structural and functional analysis of hypothetical proteins of *Leptospira interrogans*. *Biochem. Pharmacol.* **3**: 3–6.
- Boots, M. & Bowers, R.G. 1999. Three mechanisms of host resistance to microparasites avoidance, recovery and tolerance show different evolutionary dynamics. *J. Theor. Biol* **201**: 13–23.
- Bray, E.A., J., B.-S. & Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. in: biochemistry and molecular biology of plants. *Am. Soc. Plant Physiol.* 1158–1203.
- Brenner, D.M., Baltensperger, D.D., Kulakow, P.A., Lehmann, J.W., Myers, R.L., Slabbert, M.M., *et al.* 2015. Genetic resources and breeding of amaranthus. *Plant Breed. Rev* **19**: 227–285.
- Bressani, R., Gonzáles, J.M., Zuñiga, J., Breuner, M. & Elias, L.G. 1987. Yield , selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species. *J. Sci. Food Agric* **38**: 347–356.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A. & Pickett, J.A. 2007. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* **173**: 603–608.
- Bruce, T.J.A. & Pickett, J.A. 2007. Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Sci. Direct* **10**: 387–392.

- Casarrubias-Castillo, K., Martínez-Gallardo, N.A. & Délano-Frier, J.P. 2014. Treatment of *Amaranthus cruentus* with chemical and biological inducers of resistance has contrasting effects on fitness and protection against compatible gram positive and gram negative bacterial pathogens. *J. Plant Physiol.* **171**: 927–939. Elsevier GmbH.
- Caselato Sousa, V.M. & Amaya Farfán, J. 2012. State of knowledge on Amaranth grain : a comprehensive review. *J. Food Sci.* **77**: 93–104.
- Castrillón-Arbeláez, P.A., Martínez-Gallardo, N., Arnaut, H.A., Tiessen, A. & Délano-frier, J.P. 2012. Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization , utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory. *BMC Plant Biol.* **12**: 163.
- Chapin, F.S. & Mcnaughton, S.J. 1989. Lack of compensatory growth under phosphorus deficiency in grazing-adapted grasses from the Serengeti Plains. *Oecologia* **79**: 551–557.
- Chaves, M.M. & Oliveira, M.M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits : prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* **55**: 2365–2384.
- Cisneros Hernández, I. 2016. “ Cambios en la expresión génica de reguladores maestros del metabolismo en respuesta a la defoliación severa en amaranto de grano” (Tesis de maestría no publicada). CINVESTAV, Irapuato, México.
- Clouse, J.W., Adhikary, D., Page, J.T., Ramaraj, T., Deyholos, M.K., Udall, J.A., *et al.* 2016. The Amaranth genome: genome, transcriptome, and physical map assembly. *Plant Genome* **9**: 1–14.
- Costea, M. & DeMason, D.A. 2014. Stem morphology and anatomy in *Amaranthus L.* (*Amaranthaceae*) --taxonomic significance. *Torrey Bot. Soc.* **128**: 254–281.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. & Shinozaki, K. 2011. Effects of abiotic stress on plants : a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* **11**: 163. BioMed Central Ltd.
- Damme, E.J.M. Van, Peumans, W.J., Barre, A. & Rougé, P. 1998. Plant lectins : a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **17**: 575–692.
- Datta, K., Baisakh, N., Ganguly, M., Krishnan, S., Shinozaki, K.Y. & Datta, S.K. 2012. Overexpression of Arabidopsis and rice stress genes inducible transcription factor confers drought and salinity tolerance to rice. *Plant Biotechnol. J.* **10**: 579–586.
- Délano-Frier, J.P., Avilés-Arnaut, H., Casarrubias-Castillo, K., Casique-Arroyo, G., Castrillón-Arbeláez, P. a, Herrera-Estrella, L., *et al.* 2011. Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Genomics* **12**: 363.
- Délano Frier, J.P., Martínez Gallardo, N.A., Martínez De La Vega, O., Salas Araiza, M.D., Barbosa Jaramillo, E.R., Torres, A., *et al.* 2004. The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. *J. Chem. Ecol.* **30**: 1001–1034.
- Dhanyalakshmi, K.H., Naika, M.B.N., Sajeevan, R.S., Mathew, O.K., Mohamed, S., Sowdhamini, R., *et al.* 2016. An approach to function annotation for proteins of unknown function (PUFs) in the transcriptome of indian mulberry. *PLoS One* **11**: 1–18.
- Espitia Rangel, E., Mapes Sánchez, C., Escobedo López, D., De la O-Olán, M., Rivas-Valencia, P. & Martínez Trejo, G. 2012. Amarantho : ciencia y tecnología. pp. 3–354. México, D.F. INIFAP.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, Y., Eddy, S.R., *et al.* 2014. Pfam : the protein families database. *Nucleic Acids Res.* **42**: 222–230.
- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **55**: 307–319.
- Galperin, M.Y. & Koonin, E. V. 2004. Conserved hypothetical proteins : prioritization of targets for experimental study. *Nucleic Acids Res.* **32**: 5452–5463.
- Gao, Y., Badejo, A.A., Sawa, Y. & Ishikawa, T. 2012. Analysis of two L -galactono-1 , 4-lactone-responsive genes with

- complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **1**: 592–601.
- González Rodríguez, A.T. 2016. Estudio de la expresión de genes codificantes de enzimas clave en la síntesis de trealosa y oligosacáridos en amaranto con distintos niveles de tolerancia a estrés hídrico. (Tesis de maestría no publicada). CINVESTAV, Irapuato, México.
- Grubben, G.J.H. 1975. Culture of the amaranth, a tropical leaf vegetable, with special referente to South Dahomey. *Medelelingen Landbouwhogeschool Wageningen* **75**: 6.
- Grubben, G.J.H. & Sloten., V. 1981. Genetic resources of amaranths: a global plan of action. In: (A. I. 80/2. I. FAO, ed), p. 57. Roma, Italia.
- Guengerich, F.P., Tang, Z. & Salamanca Pinzón, S.G. 2010. Characterizing proteins of unknown function. *Mol. Interv.* **10**: 153–163.
- Halversont, L.J. & Stacey, G. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Reviews* **50**: 193–225.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773–1791.
- Heil, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.* **178**: 41–61.
- Howe, G.A. & Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Plant Immun. to Insect Herbiv.* **59**: 41–66.
- Huerta-Ocampo, J.A., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, C.S., Espitia-Rangel, E., Mock, H.P. & Barba De La Rosa, A.P. 2014. Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L. *J. Proteome Res.* **13**: 3607–3627.
- Huerta, O.J., Briones, C.E., Mendoza, H.G., De Leon Rodriguez, A. & Barba de la Rosa, A. 2009. Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *Int. J. Plant Sci.* **170**: 990–998.
- Kadereit, G., Borsch, T., Weising, K. & Freitag, H. 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C4 photosynthesis. *Int. J. Plant Sci.* **164**: 959–986.
- Kietlinski, K.D., Jimenez, F., Jellen, E.N., Maughan, P.J., Smith, S.M. & Pratt, D.B. 2013. Relationships between the weedy *Amaranthus hybridus* (Amaranthaceae) and the grain amaranths. *Crop Sci.* **54**: 220–228.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-shinozaki, K. & Shinozaki, K. 1994. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L. : identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Mol. Biol.* **25**: 791–798.
- Knoerster, M., Van Loon, L.C., Van Den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. & Linthorst, J. 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Plant Biol.* **95**: 1933–1937.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F., *et al.* 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt , osmotic , and cold stress. *Plant Physiol.* **130**: 2129–2141.
- Lamesch, P., Berardini, T.Z., Donghui, L., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., *et al.* 2011. The *Arabidopsis* Information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* **40**: 1202–1210.
- Lei, Z., Tian-Li, H., Feng Zhao, J., Song, Y., Jun Zhang, C. & Guo, Y. 2009. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electroforesis. *Plant Physiol.* **149**: 916–928.
- Leung, J. & Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **49**: 199–222.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**: 402–408.
- Loewenstein, Y., Raimondo, D., Redfern, O.C., Watson, J., Frishman, D., Linial, M., *et al.* 2009. Protein function annotation by homology-based inference. *Genome Biol.* **10**: 1–8.
- Luhua, S., Hegie, A., Suzuki, N., Shulaev, E., Luo, X., Cenariu, D., *et al.* 2013. Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiol. Plant.* **148**: 322–333.

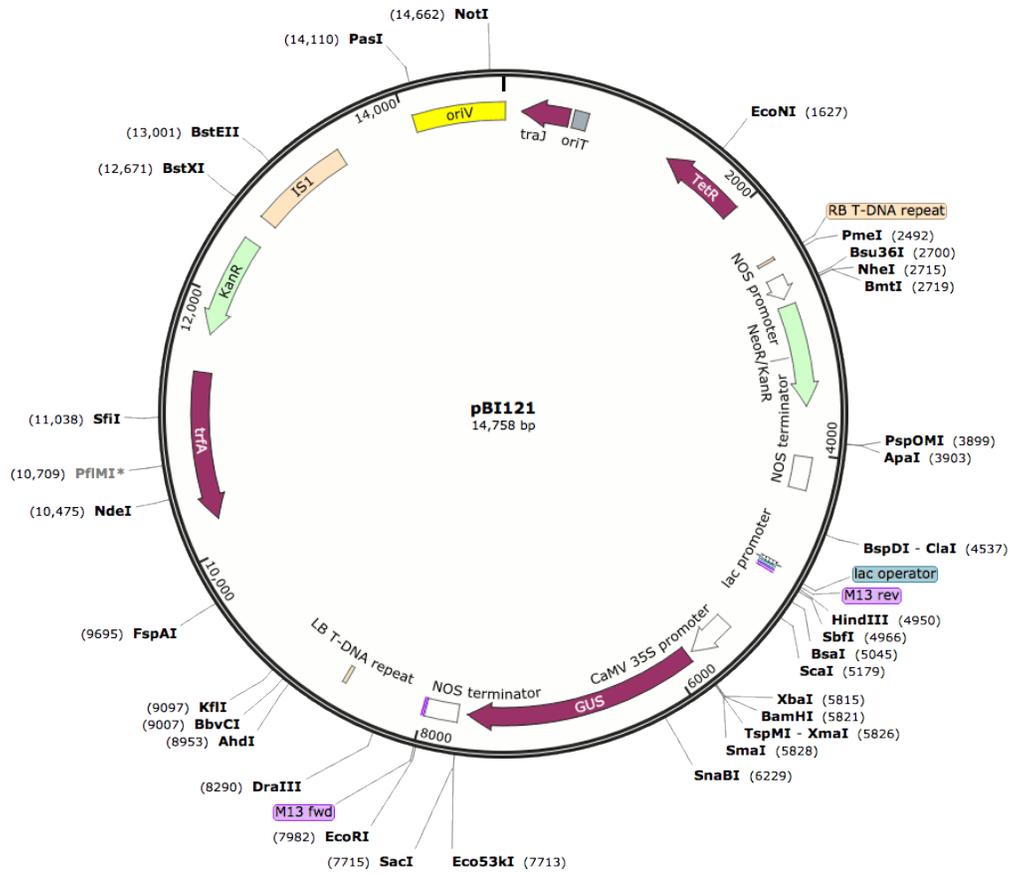
- MacNeish, R.S. 1964. Ancient mesoamerican civilization. *Science* (80-.). **143**: 531–537.
- Mahajan, S., Mahajan, S., Tuteja, N. & Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**: 139–58.
- Marcone, M.F., Kakuda, Y. & Yada, R.Y. 2004. Amaranth as a rich dietary source of β -sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods Hum. Nutr.* **58**: 207–211.
- Martínez Moreno, D., Nuñez Farfán, J., Terrazas, T., Ruiz, P.L. del M., Trinidad Santos, A., Trejo L, C., *et al.* 1999. Plastic responses to clipping in two species of *Amaranthus* from the sierra norte de Puebla , Mexico. *Genet. Resour. Crop Evol.* **46**: 225–234.
- Martirosyan, D.M., Miroshnichenko, L.A., Kulakova, S.N., Pogojeva, A. V & Zoloedov, V.I. 2007. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis.* **12**: 1–12.
- Massange Sánchez, J., Palmeros Suárez, P., Martínez Gallardo, N., Castrillon Arbelaez, P., Aviles Arnaut, H., Alatorre Cobos, F., *et al.* 2015. The novel and taxonomically restricted Ah24 gene from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) has a dual role in development and defense. *Front. Plant Sci.* **6**: 1–19.
- Mithofer, A., Wanner, G. & Boland, W. 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves . II . continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiol.* **137**: 1160–1168.
- Munns, R. & Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance : bringing them together. *New Phytol.* **167**: 645–663.
- Musser, R.O., Farmer, E., Peiffer, M., Williams, S.A. & Felton, G.W. 2006. Ablation of caterpillar labial salivary glands : technique for determining the role of saliva in insect – plant interactions. *J. Chem. Ecol.* **32**: 981–992.
- Nobuhiro, S., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E. & Ron, M. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol.* **203**: 32–43.
- Omami, E.N., Hammes, P.S. & Robbertse, P.J. 2006. Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranth (*Amaranthus* spp.) genotypes. *J. Crop Hortic. Sci.* **34**: 11–22.
- Palmeros-Suárez, P.A., Massange-Sánchez, J.A., Sánchez-Segura, L., Martínez-Gallardo, N.A., Espitia Rangel, E., Gómez-Leyva, J.F., *et al.* 2016. AhDGR2, an amaranth abiotic stress-induced DUF642 protein gene, modifies cell wall structure and composition and causes salt and ABA hyper-sensitivity in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, doi: 10.1007/s00425-016-2635-y.
- Panavas, T., Pikula, A., Reid, P.D., Rubinstein, B. & Walker, E.L. 1999. Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Mol. Biol.* **40**: 237–248.
- Pandey, S.P., Minesinger, B.K., Kumar, J. & Walker, G.C. 2011. A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq. *Nucleic Acids Res.* **39**: 4691–4708.
- Pieterse, C.M.J., Wees, S.C.M. Van, Hoffland, E. & Pelt, J.A.. V. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225–1237.
- Punta, M., Coggill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Bournsnel, C., *et al.* 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **40**: 290–301.
- Puthoff, D., Sardesai, N., Subramanyam, S., Nemacheck, J. & Williams, C. 2005. Hfr-2 , a wheat cytolytic toxin-like gene , is up-regulated by virulent Hessian fly larval feeding. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 411–423.
- Ralph, S., Oddy, C., Cooper, D., Yueh, H. & Jancsik, S. 2006. Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) : normalized and full-length cDNA libraries , expressed sequence tags , and a cDNA microarray for the study of insect-induced de. *Mol. Ecol.* **15**: 1275–1297.
- Ramirez, V., Coego, A., Ana, L., Agorio, A., Víctor, F. & Pablo, V. 2009. Drought tolerance in *Arabidopsis* is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. *Plant J.* **58**: 578–591.

- Reymond, P., Bodenhausen, N., M.P., V.P.R., Venkatesh, K., Dicke, M. & Farmer, E.E. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* **16**: 3132–3147.
- Rodríguez, M.A. & Salinas, J. 2009. Prefoldins 3 and 5 play an essential role in Arabidopsis tolerance to salt stress. *Mol. Plant* **2**: 526–534.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H. & Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809–1819.
- Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T. & Iwabuchi, M. 2004. Arabidopsis Cys2 / His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought ., *Plant Physiol.* **136**: 2734–2746.
- Sakamoto, H., Matsuda, O. & Iba, K. 2008. ITN1 , a novel gene encoding an ankyrin-repeat protein that affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt-stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **56**: 411–422.
- Sauer, J.D. 1967. The grain amaranths and their relatives : a revised taxonomic and geographic survey. *Missouri Bot. Gard. Press* **54**: 103–137.
- Schwachtje, J., Minchin, P.E.H., Jahnke, S., Dongen, J.T. Van, Schittko, U. & Baldwin, I.T. 2006. SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *PNAS* **103**: 12935–12940.
- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J., Lee, Y.N., Kim, S., *et al.* 2009. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response. *Plant Physiol.* **151**: 275–289.
- Shirasu, K., Nakajima, H., V., R.K., Dixon, R.A. & Lamb, C. 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**: 261–270.
- Simms, E.L. 2001. Defining tolerance as a norm of reaction. *Evol. Ecol.* **14**: 563–570.
- Soeda, Y., Konings, M.C.J.M., Vorst, O., Houwelingen, A.M.M.L. Van, Stoop, G.M., Maliepaard, C.A., *et al.* 2005. Gene expression programs during Brassica oleracea seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol.* **137**: 354–368.
- Summermatter, K., Sticher, L. & Métraux, J. 1995. Systemic responses in Arabidopsis thaliana infected and challenged with Pseudomonas syringae pv syringae. *Plant Physiol.* **108**: 1379–1385.
- Thornton, B. & Chhandak, B. 2011. Real-Time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **39**: 145–154.
- Ulbricht, C., Abrams, T., Conquer, J., Costa, D., Serrano, J.M.G., Taylor, S., *et al.* 2009. An evidence-based systematic review of amaranth (Amaranthus spp .) by the natural standard research collaboration. *J. Diet. Suppl.* **6**: 390–417.
- Van Damme, E., Lannoo, N. & Peumans, W.J. 2008. Plant lectins. *Adv. Bot. Res* **48**: 107–209.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T. & Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins definition of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **12**: 245–264.
- Vandenborre, G., Smagghe, G. & Damme, E.J.M. Van. 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry* **72**: 1538–1550. Elsevier Ltd.
- Vargas-Ortiz, E., Espitia-Rangel, E., Tiessen, A. & Délano-Frier, J.P. 2013. Grain amaranths are defoliation tolerant crop species capable of utilizing stem and root carbohydrate reserves to sustain vegetative and reproductive growth after leaf loss. *PLoS One* **8**: 1–13.
- Vassileva, V., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N. & Feller, U. 2012. Long-term field drought affects leaf protein pattern and chloroplast ultrastructure of winter wheat in a cultivar-specific manner. *J. Agron. Crop Sci.* **198**: 104–117.
- Venskutonis, P.R. & Kraujalis, P. 2013. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables : a review on composition, properties, and uses. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**: 381–412.

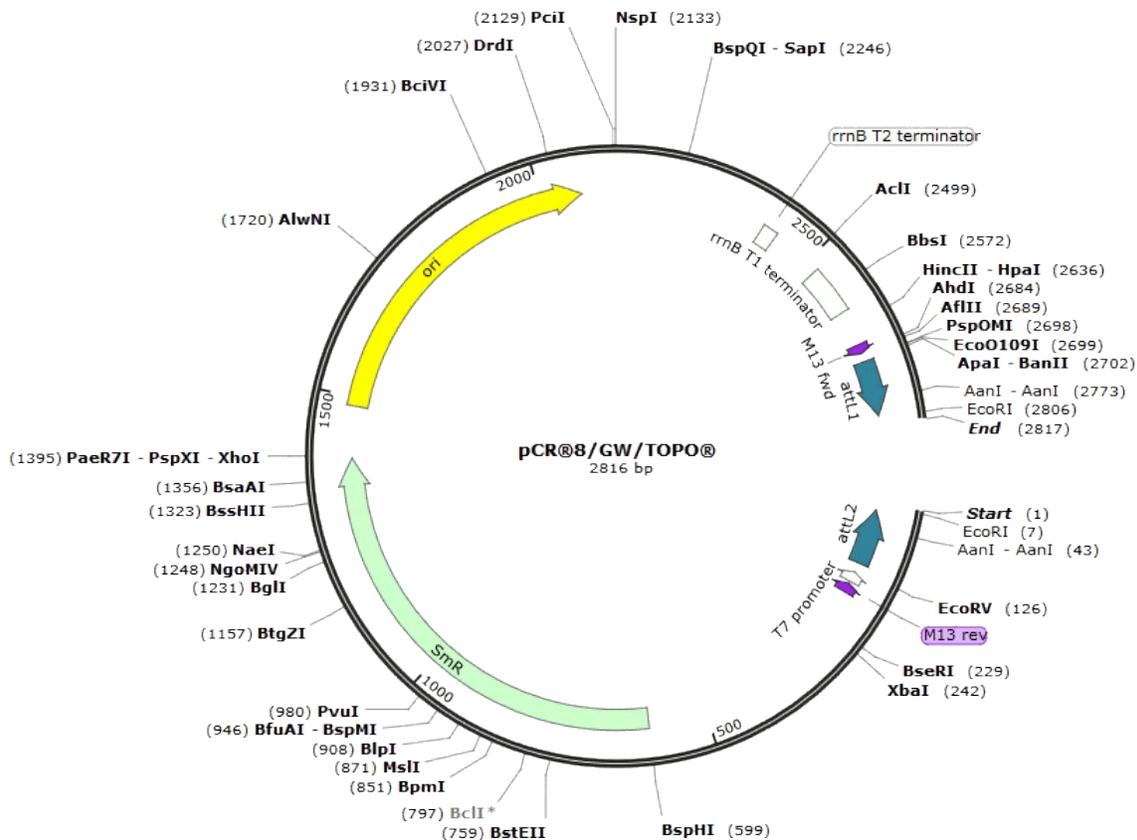
- Vinocur, B. & Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress : achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 123–132.
- Voelckel, C., Weisser, W. & Baldwin, T. 2004. An analysis of plant – aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Mol. Ecol.* **12**: 3187–3195.
- Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1–14.
- Yordanov, I., Velikova, V. & Tsonev, T. 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* **38**: 171–186.
- Zhao, Y., Ma, Q., Jin, X., Peng, X., Liu, J., Deng, L., *et al.* 2014. A novel maize homeodomain – leucine zipper (HD-Zip) I gene , Zmhdz10 , positively regulates drought and salt tolerance in both rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **55**: 1142–1156.
- Zúñiga-Sánchez, E., Soriano, D., Martínez Barajas, E., Orozco-Segovia, A. & Gamboa-Debuen, A. 2014. BIIDX1 , the At4g32460 DUF642 gene , is involved in pectin methyl esterase regulation during Arabidopsis thaliana seed germination and plant development. *BMC Plant Biol.* **14**: 1–13.
- Zúñiga, S.E. & Gamboa de Buen, A. 2012. The two DUF642 At5g11420 and At4g32460-encoded proteins interact in vitro with the AtPME3 catalytic domain. *Protein Interact.* **7**: 464.

XI. ANEXOS

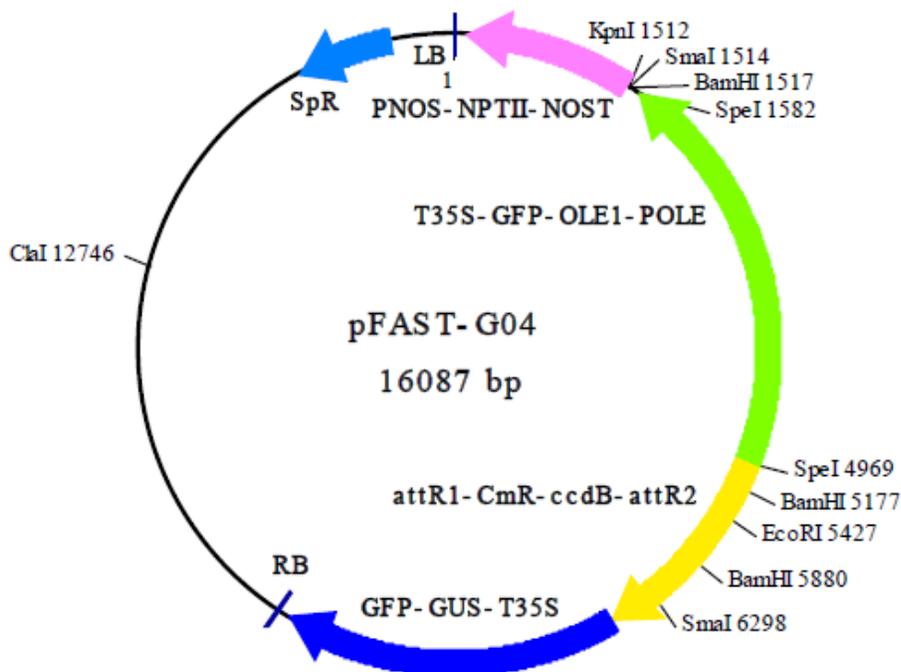
Anexo A: Mapa del vector binario pBI121 empleado para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260.



Anexo B: Mapa del vector de clonación Topo8



Anexo C: Mapa del vector binario Pfast-G04 empleado para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260.



XI. APÉNDICES

APÉNDICE 1. Características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la cuantificación de la expresión por qRT-PCR. NE (No Encontrada).

<i>Gen</i>	<i>Secuencia (5'→3')</i>	<i>T_m(°C)</i>	<i>Longitud (pb)</i>	<i>ΔG dímero (kcal/mol)</i>	<i>ΔG Lazo/asa (kcal/mol)</i>
<i>DGR</i>	AGTGATTGACCATCCAACC	63.8	20	-3.1	-0.4
	TGCGACTTCTCTACCCTCCT	62.9	20	NE	NE
<i>2880</i>	TCCGATTGACTCTTGTTGGTG	63.8	20	NE	NE
	GCTTGATGGTGTAGGATGGC	66.5	22	NE	NE
<i>ERD7</i>	GCAACACATGAAGGGATGG	64.1	19	-2.3	-0.5
	TGGGACTTGTATTTCAGCAGC	62.8	20	NE	NE
<i>Hfr</i>	GCCCAGGATAACAACCCTA	61.3	19	-1.3	-1.3
	AACATCAAGGGAAACAAGGC	62.8	20	NE	NE
<i>ZnFinger</i>	GCTTAGATTTCTGGACTTGCCG	65.8	22	-1.3	NE
	TTCCCGTGTCTCACTTTCCGGT	66.6	20	-2.4	-2.4
<i>DUF3407</i>	CTGGACGAGATATGCCGAA	63.8	19	-0.5	NE
	CAGCAGATAGGTTCCACGACT	63.2	21	NE	NE
<i>3844</i>	TCTACTATGGTGGCAGAAATGC	62.9	22	-2.0	-2.0
	GATCCTCATCATGGCAA	62.2	19	-2.3	-0.5
<i>3240</i>	GAGCCTCAGAAGTACTCGCC	63.1	20	-4.5	-1.0
	ACGAGGTTGCTATATCCCACG	64.9	21	-0.5	NE
<i>Actina</i>	CGTGACCTGACTGATTACCTTA	60.6	22	0.0	NE
	GCTCGTAGTTCTTCTCAATGGC	64.0	22	NE	NE
<i>β-Tubulina</i>	TCTCAGCAGTATGTCTCCCTCA	63.9	22	NE	NE
	TCTACTTCTTTGGTGCTCATCTT	60.9	23	NE	NE

APÉNDICE 2. Características de los oligonucleótidos utilizados para el diseño de las construcciones.

<i>Sentido</i>	<i>Secuencia (5'→3')</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Longitud (bp)</i>	<i>%GC</i>
Directo Promotor HFR	TATGTGCATCGTACGGTTATTATCTAGTTAATAATAATATAGAACAC	68.9	47	27.7
Reverso Promotor HFR	TATTCGCTCACTTATTGTTTATGGGGGCTAGTCATATAAT	72.9	40	35.0
Directo Gen 2880	GGGAAGGGTCTAGAATGGATTCTCGCCGATCAACTT	79.8	36	50%
Reverso Gen 2880	GGAGCCC GGGAACCTTCAACGCCAACTGATCT	83.2	32	59.4%

MRMANLILLSVLLLLLAICHSISAFTDGLLPNGDFEKAPRPSDLKGTELNHRHGLPNWEVSGFVEYIESGHKQGDMLLVVPEGAYAVRLGNEASIKQSVPTKGLNYAIF CAARTCAQEETLNISVTPWVGLPMQTLYSSSGWDCYAWGFVALSNVAEILHNPGVEEDPACGPLIDAVAMRLLYPPKRTNVNLLKNGNFEEGPFIFRNTSWGTLIP PNIEDAHSPLPGWMVESLKAVKFDISGHFFVPSGRRAIELVAGKESIAIQVVRTIPGKLYALTFAVGDANNACTGSMVVEAFAGKDTVKVPYESKGGKGGYKRAVLRV ATQTRTRIMFYSTFYSMRSDDYASLCGPVIDDVRLVSVRRP			
Uncharacterized protein LOC104887687 [<i>Beta vulgaris</i>]	100%	88%	367 aa
Transmembrane protein, putative (Protein of unknown function, DUF642) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	99%	72%	369 aa

Gen 2880	Isotig: 02880	486 pb
TTCATTGATGAAGCCGATAAACCTGATACAAAAATTTTCATAATAACAATCAATCATAAGTTAGTAAAATTACGGACAATAATAAGAATGTTTAGCAAAAATTAATTA CTACTAAATGTATGTTACTACATCTTAACATCGCTAACACGTGTACATAGAAATACATTAATTTCAAATATTTTTAAGGAAAATAGGATAACATGGCTATGCAC GTGCCCCACCAACTAGTAAAAGAAAAACCCACAATCAAATTTAAGCATCATTTCTTCCGTTGTTAGACAATTTTTCAGGTTGTAGAAGGTGTGTATGTTAATGG TTGAAGGGAGGGAGATGAATAAATCAGAAAACTTTTATCTTTCCAAAAACACAACAGTTTGCTTGGTCTTTGGAATGACATGCGCGTGGGTTTTCAAAAACATC AGTTACTGTTTTATTTTTTTTTAATTTCACTTTCTAAAAACAGAACTTTGGGATTGTGGGTGAGCTGTCTTGAGGGACGTCTATAGTATAGACGATCTCTCAA GAGACCGCCTGATTTTCTATATATTACAATTCAAATATACACTAATTACAATAAAAAAATAGGAAAATTACCTAGATTAATCCAACCTTATCATGATTTTCCTACA ATAATCCACTTATTGATTAAGTATAACTAGTCTCAATTTTTGAAGGGTATTTGTAAATCAAATATTCGAGTGTACCAGACAATATTAGGTATATGTGGTTTTTCT CATATGTTTAATTTATTTCCCTTACACAAAGATTACATTATACACAATTTTGAATAATGTTTACTTATATCAAAAAAATTTACTTAATAAGATTGATCAAAAAT TTAATTTGCAATTTGTTAAATTTTTCAAAATACAACCTAATGTATCCTTCTATGAGCGGGATACACTGGGTGACGATGATGATGATGAATCTAATATTTTA AAGGATACAATTAACACATAGTCATTAACCTCCATAAATCAATTTACAAGTCGTAATTAATTATGGATTACATTTGAACACAAGTTTTCATAAATTTTAGATTTCAA GTGTTTGCTTACCCTTGATGCGAAGCGGATGAAGTGTCTATCTCGAGTTATGTTTTATCAAATGCTCTTGGAATGATCAAGAGTTCATGGCCGCTTTGTTCTAT AAAATTTCAATTTTGATCTAAAAATGATCAATTCATACCTTAAAATGATCCATTAATGAATGCTCTTGAGAAATGATCAATTTGTTTGTACTTGGTTATAAAAAAT TTCAATTTTTATCTAAAATAATTAATAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA GGCCAACTGTTAAATCTGTGGACACTAAGAAATACCACCATTTGTAGAGTTGGATTGTTCAATTACAGCCAAGTGGACCCACAACAGAAAGTGAAGGAGAGGG CTATTTTGGTAACTAAAAAAGCACCGAACAATACATCTTGTATTGAATTGAATTAATAAAACCAGCAATACCAAATACTTTATTACAATCTCAACATTATACTACCT CCTATTC AACCCATTAGTCCCATTGATTTTTCACACTTGCCAAGACAACATTTAATCTTTAGTATCTCTAATTTTTTTTTAAATAAAAAATTATAAAAAAGTAAATATTA ATAATCTTTGTATTGAGACGAATCAAACAAGATCCCACGTGACTATGTTTTAACTTATAGATTAACAATAAAATACAAATTAAGAGTGATAAGTGAATAGTGAAAA AAAATCAATGAGACTAATGGGTAGAATAGGAGGGAGTATTTATATACTTGAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATACCCCTGAAGACTGAAACCAACCAGACAGCC ATAACCCCTTTTTTTTCTTCTGCTTTTATTTAATCTGCAATCACAGACAGTCCACCATACATGACTCATATGACATAACCATCAAACCGTAACCTTTTCATCATCATT CATACCCATCTTCTCTTAGGACCAATAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG CTTTGTAGGAAAGGGGTGAAAAAACATGGCTAATGTATTGTAATTGTAATGTCTCCAACAAACAAAGCTCATTATTATCATTATTTCTTTCTGAAAAAT ATATTCCATAAATACCCTCCCTTGTGCTTGTATTCTGAGAGAATGGGTGATTGCCACACCCACAATGCCCCCATTTCTATCCAAGTTCACCTTCATCACAAG CCACCAACTTTCTCTTCTCATATATTTTTCTTGGGCCCTTTTTGGGTTTTCACTTCTCAACTTCTCTTCCATTCAATGTTCCACAGAAAAAAGAGAAAGTG AGAAACTTCAGCCTTCTTCTCTATATTACATTTTACACCTTCTCTCTTTCTCTCTCTTATTATTATTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGAAATCTTATCTTTTT CTCTGTTCTTCTTTTTATTAGGGTTTTCTTCTTTTTCTCTGTTTTCTCTCTGTTTCTAGGGTTTGTGTTTTCGGTTGATTCTTGCAGATTTGGGGGAAATTGGTTG ATGGGTATTTGATTGATCGAAAGATTGTTAAGGGTTTTCATGATTCTCGCCGATCAACTTCTGTTGACGAGATTGCTAAAATTAGGGAAAAACATCAGTCTTT GTTGCAAGATTACTTGGTCTTGCAAAGGATTGTGTATCAAAGAAGAGAAAGCTAAAGGAAACAAATGAAAAGAAAGAGACTCTTTTGGATGAAATTAGGTTTCT AAAGCGTAGACGAAATCTGTTGTCGAAGTTGAAATCACAAAAGCTTCAACCACAACAAGATACCATTAGTTACAAAAGCACCTTCAACATGAAGTTGGACA AGGTGGAAGTCGCGCAAGCACGAGTGAGCCACAATTGCAAACCTCATTGTTAGCAGTTGGTTCGATTTGGAATTCGGCTAGCCTCCCTAGAGAGGAAGTTGGT TTTTCCGTCGGTGAATTAGGGAAAGATCCAAGGATTTGTTAGTAATGGCAAAGAGTTGAGAAGAGGAAAAATTTCTTGGCAAGATCAGTTGGCGTTGAAGGT		

TTAAAGTGTGGAACTTAGTTTTGTGCAGAAAACAGGAGTTGACTGATTCTTTCTTTTATCAATAGCTTATTTCTATAGAATACATAGAGTGTTAAAT ATGTGTCTTAGTAGCAATGCCTTGGAACTTGTGGATATGTGATGGATCAGTTTTATATGAAATTTTCAATGAATTGTTGTCAAATAATAAGAGGA TTATTTTCAGTGTAGTGTCTTGTGGTGTAGGATGGCATTATCAAACCAATACCAGTAGATTTTTATTTTTATTTGTGAAGTTAAGATGAT ATTACCACCACAAGAGTCAATCGGAAAACCTGTTTGTATCACAGACATGAATAAGATTTTCGTACATCCAACCCCTTCAAACCC			
5'→3'			161 aa
MDSRRSTSVDEIAKIREKHQSLLDYLVLQKDCVSKRKLKETNEKKETLLDEIRFLKRRRNLSSKLKSQKLQPQDITLQKAPLQHEVGQGGSRASTSEPQLQTPLL AVGSIWNSASLPREEVGFPSVKLGKSKDLFNSNGKRVEKRKISWQDQLALKV			
Uncharacterized protein LOC10488777 [<i>Beta vulgaris</i>]		100%	75%
No existe similitud [<i>Arabidopsis thaliana</i>]			161 aa

Gen ERD7	Isotig: 05258	1399 pb
TCTTCAGGTTTGTCAAATGCAAAAGAACTCCACAACCGTAAATTCATTTACGATATTCCTCATAATTTTGTTTCATCGAACCTAAATATAATTAATAACATCAATAA CATAAGTAAGCTAATATTAATTATTATAGAATATGAAAAGTATAAAAAACACAAATCGTATAAACCGTGCAATTTGCCCTAGAATAGAATTGCACAACTGCATGC ATATGCATTTGGCCTAGGCAAACTGCTCACTTATGCATTTTCTCCTATGAAAAATCCGACAACATGAAATTTAATTGATCTAATTACAAGATTTGTGTCTTGAA TATTTAGGAAAATCCAGAGTATATATGTTCAATTTGTGTGTACAAAATACTAATACATACTCCTAGAATATAATATTAAGTTTTTTTTGAGTGAAATTGTGCGATTTTA GAGGCTTGAGAAAGTACTACTATTACATGGAGACAAAATTTGAACCCGATCGACCCGAAAGCGACTTAACCCGAAACATGACCGACGCGATAATTACCTGACC GGCAACCGACCCGTTTTGACAAGGTCCGATATCAATTTTGAATTAATCTCAATGTTGGAATTCATTTCAAATAAAGTTTTAGTTTTAAAGTATCTCAACACATTG AGTATATCATTTGAACCCTAAAATAATCAATAGATCTCAAAAAACACGCATTTAGCGTTTTTTATCCATCGTAATTATTTCTTTAAAAAATGACGTTATAATCAT CTTAATTGAATACATATATCTTGTTAAATCAATCAATGAGTTTTAATTCTACATTTAGTAAGTAAATCGATATTATTTGTAAGAATGTTTTGCACATTTAAAGGAC CTTTTCAGAAAAGGAATGTCGCTATCCTATATTATAAAACGCATATCTTATAAGTTCGAAATAAGTACTTAGTTATTTGTAATTTTTCCAACATGAAAATTGTGAAA TTACTTTTTATGAGGATATGAGAAGATATTTAACGTCATTTTTATCTACCATTACAACCTCAATAAACACAATGATTTTTACGAAGCGCGTATCTTACAAATCTTTC AAAATAAGTATTAATTTCCCTATTTTCTTACACTTAAATGAACCCGACATACCAACTATTTTTGAAAATCTTACATCTAATTTCTCTAATATGACACGTATCTCAC AATCCAACCTATACATAAAGATTTAATGTTTAGAACACGAGCGTCCGCAATTAAGTTGCTTATAAATTGAAATTCATCACAATTCACATAAGACTTTAATATCGTC AATTGATATGTGGATTAATGTCATAGGGATGAGAAATAGTTTCTTTATTAATAAAGTTTCATAAATAATAAAAAATGAAAAAATCAATTTTTACATTTTATAAGTC GTAATCCAATGGGTCAGACCGACTGACTGACCAAGAGCCGGGAGTAACCTCGACCCAAAATAATCCGAAACGATCCGACCGAAACTAATCCGACCCGTAACCTA TTCGACTGACCGTATTCGAAAATTTGAAATAAAAAAGATTATTTATATAAAAAAAGCATAACAATAAGATTATAATCAAACCTATTGCAAACTAAGCGTGTAAATC CGAAACCTTAGGTTCCGGCTGTCGCACTGCACTTAGTAAGTGCAAACAGACTGAAAACCTGAAACAGGATGTTCCGCAACAACCTGTTTTAGATTTTCAGTCT GCTCGCACTTACTAAGTGCGAACAACCTTTGTCTTAAAACCAGCATGTTGACCCTGTTTGACCTGTTCCGAGTACTAAGTGCGAACAGACACTTGATTTGTTTT TATCAGTTTATTACTGTTTCGTACTTACTAAGTGCAAACAGCCCCGAACCTGTGTTCTGGAGTATTAGGCGCTTACATTTAATAAGTTTAAATTTGAATTTTATTGC ATGCTTTTTTTTATTAAGAGTCTTATCTATTTCAAATTTTCCGATTTCCCAAGTCTACACGGAGTCAAGTTATCGGTACTAGCGCGGGAGTTATACAGGGCCAC AAAATATAAAAAAAGTATTTCTCTCTGCTTCCCTACGCGAAGTTCCACGTTCTTCTCTGCAACTTCCATTAAGCTTTCTTCTTCC CAATCCTCTTAAATCCGCCATTTTCGATTGACACTCCTTCTCCATCTTCCATTTCAACAATGCGTCTCAAGAAAATCATTCTAATGCACGACAATCATTATA CCCTAATATTGATCAATCCAACCCGATTCTTCTCCCTTTTCAATTTCTAACCTAACCTAATTTTATCCTAACTCGAATCCTCAATCATCTTCGTCTTTTATC CTTCCATTCATAGGGAAGATTTTCGTGAAAACCTTTTTCTGACGGTACCATAACCCTAATTTCTACTACAGGAACTCATTCTGATCCCGAACTCCTTCTGCTC		

CTCCTGAACCTGAATCTGAACCTGTTCAAGAAACCCTGATTACTGTTCTGCTGCTGTTGTCAATCTTATTGATCAAAATTAACAGCGTCGAGCTTGCTTTTGGAGATTTTTTCGGTTCTGCGAATTCGTCAGGTGATAATACCGTTGCTATTCTGGCTTGTGTTTCCGATGAGGTTCAATGGCCGCTGATTAAGAAGAGGCGATTGTCAAAGTTGATGATTCACATTATTTCTTCTTTATCGGATTCTAAAGAAGGGGATGAGGTTTTAAATTATGGGTTGACTTTTGCTTCTAAAGGACAAGAGGGTTTGCTTAAGGAATTGGATGTGCTTTTTGGGAGTTTTGGGAATTTACAGTGCAGAGTGTATCAGAAAGGAGTAGAGGAGGTTTGGCAGAGGTGGATGTTTCTGGTCA GATATCACCCGAGGAATTGAAATCCGATGAGAATAAGAGAGTGGCAATGGAGAGGAGTTGTGGAGCTTATTGGACCACGCTGGCGCCCAACGTAGAGGAGTA TAGTGGCTCTGCTGCTAAGTGGATTGCTGCCGGGTCAGGGCATCTCATTAAAGGGATTTGTGGTGTGGAGATATAACTGTGGATAGGTTGAAGTGGGGTCAT GAGGTGTTGAAGAAGAGGCTTGATCCTGCTGAGAAGAAGGAGATTGACAAAATACAATGAAGAGGATTAAGGGGTGAAAAGGATGACAAAATGACCAAGC AGGTAGCGACTGGTGTGTTTGTCTGGCGTTGTAAGGTTTCAGGATTCTTCACTAGTTCAGTGGCTAACTCAAAGTGGGAAAGAAATTCCTCAGCTTATTACCTG GGGAAATGGTGTGGCATCACTGGATGGATTCAATAGAATCTGTGATGCTGTTGAAGTAGCTGGAAAGAATGTCATGTCAACAACATCTACTGTAACACTGGA CTAGTGACACACAAATATGGAGAGGAGGCTGGTAAGGCAACACATGAAGGGATGGGTGCAGCTGGACATGCAATTGGTACTGCATGGACTGTGTTCAAGATC CGGAAAGCCTTAAACCCTAAGAGTGTCTTAAACCTACGACTCTTGCAAAATCTTCTCTTAAAGCAGCAGCTGCTGAATACAAGTCCCAAAAGAGTTCGAAATG ATCACCGCTATGCCTAGGAGCCTTCCAATGATATGTAAGTACATCTTAGCACTGGTTTCAATCAGTCTGTTGTAACATTTGTTTGATCCATTTATTGTATAACA TTTAATTTTGGAAATTGGTACTTGCTAGTATATACTGTAACCTTAAACGATATCTTTGAATTGTTTCTTGTGTATAAGATCTGGTTCC			
5'→3'			225 aa
MERSCGAYWTTLAPNVEEYSGSAKWIAAGSGHLIKILWCGDITVDRLKWGHEVLKKRLDPAEKKEIDKNTMKRIKRVKRMTKMTKQVATGVLGSGVVKVSGFFTSS VANSKVGKKFFSLLPGEMVLASLDGFNRICDAVEVAGKNVMSTTSTVTTGLVTHKYGEEAGKATHEGMGAAGHAIGTAWTVFKIRKALNPKSVLKPTTLAKSSLKAAA AEYKSQKSSK			
Uncharacterized protein LOC104895177 [<i>Beta vulgaris</i>]		100%	464 aa
Senescence/dehydration-associated protein-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]		97%	452 aa

Gen <i>HFR</i>	Isotig: 0674	1569 pb
TATATATATATATATATATATAACTGTTTCATAGTCAAATGAAATTTAACTATAATGTAATTTTATTTCTTAAAATTTAAATTTTTTTAGTTTCATACAAATATG TTAGAAATTTAAAAAAAATATGTGCATCGTACGGTTATTATCTAGTTAATAATAATATAGAACACTATTTGGAAGGCTAGGAATACTTGTGTTTAGCGGTCTTTA ATTTGTTCTATACCAGATGCTGTTGTTAAGGAGCTCAAGCATAGTATCTGTTTCCCTATTAAGAGTCTTCCGAGAGACTATTAGATTATACGAAGATTTGTTA GTAGTTGCTTAGTTCCCTCTTGAGGCTTTCTTTGGGCTTCGTTTGATTGTATTTGTCTATGTTTGAATTAATGGATTTTTCTTTAAAAAAAATATAGAACACTTTT GAATTGGAATAACACTGGTAGCTTACAAACATTATTTTCACTCTGCTACTATTTATAAGAAATGATGTGATCTAAAATGTCATTTTAATGCAGTTTATGACTCTCT TCTTTTTATACTATAAATTTGTTACACTAAAAAAAATAATAAAGCATTTTAGTCTATTGTTACAAATATTATGAACGAATCAAGTGTATAATAAAGTCCAATAAAT ACCCTCCATTTCTTTTTATTTGTCTACGTTACTTTTTGCATGCATTTCAAATAAATTTGAGTCCCAATATCTCTTAGTACACATCATGAAAATTGTAATATTATAT AAAAAATTTCTTCGCATCAATACGATTGTAACAAGATCACTTAACGTCATTAATATACTTTAAAAATCAAATTTAAATTTACGACCTAACTAGAAAAACGT AAAGTGAACAACAAAAGAAAATGGAGAGGGTACAACGTTTTGGTCCCATAAAAGGTCTTGTGAAAGTGAACAAGGATTGATGACTTGAAGCCTATAAATAGA ACCATTGTTGGGTAAGCATTATGACTAGCCCCATAAACAATAAGTGAAGCAATAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAATAATAATAATAATAATATGCTGGTACACT ACCAAGTGTGATAGGGTTGGGATTCAATGGGATGACTTAGAGTACATAGCAGATGAAAGCCAAGGACAATGGCACAAAAGAGTGCAGGCAACAAGTCGCATG GTATTGAGTGAGAACAATTTACAAGGTTTATAGTAACTGTATCACGCACTTCTGGTTTGTATCCACCTCCAACCTGCCTTCAACAAGAAGTACCTACGACTCGAA ACCGAGAGTGGGAACCTCATTGCCGCCACCGCCGACGAGCCTGAGGAGGATCGTTCTAAATGGTCTTGCACCTTGTGTTAGGCGTGTGTTTACAAAATGGACAGT TGGGTCTCGTCCAGGCTCAAAATGGTCAACATGGTGTGAGAAATTTAATAAATCCCTTAACGTCGCGAGGAACACAAAACAATCCAATCCATTTCTTACAA TTACAAATATGGACCAACGAGTTCTGTTGCCGAGGAACATAGTATTCACTGGGGATAATAACCATCCGCTACGAGCACGAAGAAATAATTGGCTTCAGTTTCTT GCCACAAATGCACAGGATCCAAGATTGCACCACGTCGTCGAAACTTTACCCAACGGAGACGTCGCGATAATTGCCACGAGATACAATTTGTTCTGGAGGAAAT CCCCCAACAGAGAATGGATCTGGTGTGACGGCCCTCGAAATAACCCGGGCCGCGATTCCGGTATTCCGCCCGATTAGGCTAAATCCAACAACCAAGAAATTGC		

TCTCATGAATATGCTTCAAGGAAGATATTGTCAAAGATGGCCCTGGGGAACATAATTATGATTGCCTTACTGCTTCATCTGGGAATATTATTCCCCTAACGGTGAT
 GCGGGTTGGCGAGGCCATTGAGAACGACGAATAACCGACATAGTATATAGGATAGATGAGGCTCGCGTCCACGGCAAAGTGCCTATTAGAAGTCGGCAACA
 AAGCGTTGAAAATCTGGGTCCCAATGAAGCACCACAAAATGTAGAATCACTTACACCGAGATGACTGAATCTACTTTTACGCTCATCGCATAACATGGAAGATTTT
 ATATACGTCAACACTTCGGGTAAAGTCTAGTGCCCAAGCTGGTGACGGGTACGATTCAATTGTCTGCTAGTGCCTCAGGGTCTTATACATTCAACGAGGTGTCAA
 GAATATCTGTAACAGACACTGGATCCGTACAGCTACTGTCCCACCTCGTAGTAAGGTAAGTGTACCATGTTCTTATCACAAGGAAGAATGGACGTCCCCTAC
 TCTTATAAACAACGTGACATCCTTTTTGATGGAACAACCTCGTGTTACACAACCTACATGATGGTATTTTTGCGGGTGTTAATACCTTTGTTGCACGTTTTATTATCG
 GTGTACCGGAAAGCCTTGATTCTTTGGCCCAGGATAACAACCCTAGCCCTAATAATATTGTTATCTCACCGGTAACCTACTAATACTATACATCATCTTGATGCAG
 ATCATGATTTAGAACATGAACCACAGGTTCCCTCAGATTCCGATTGAGACCCGGAGATTAATAATGATGAACCACCTCTCCCTACTTCCAAACTT**TGA**TGGATCG
 ATGATTATCAATTTTTACTGAGCACTACTTGGCACTTTTTGAAAGGAAAGAATAAATATGGTTTTGCTATATGTTTGTATTTTCTATGGCCTGGGCTGCCTTGTTTCC
 CTTGATGTTATTGTCCATTGTAATCCCATTTAATGATTTTCTTCAATTTTTCTTATTTGATGTATAATATATGCGTGACATGTAATTTATCGCTAGGGGCTTCACT
 TTTTTATTTGGTTGGAATTCCTACTGTTTTCTATTACATTTTATTCCCAAATTTCCGATCAACGATTAGTAGAAAAATTAGTGTTACATTTAAAATATTAAGAATTC
 AGCAGATTATCCAACATTTA

5'→3'		522 aa
<p>MAGTLPSVIGLGFNGMYLEYIADESQQQWVKRVRPTSRMVLSENNFTRFIVTVSRTSGLIHLQTAFNKKYLRLTESGNFIAATADEPEEDRSKWVCTLFRRVLQNGQ LGLVLQAQNGQHGVRIFNNSLVARNNTNPIHFFTITNMDQRVLLPRNIVFTGDNNHPLRARRNNWLQFLATNAQDPRLLHHVETLPNGDVRIIATRYNLFWRKSPNR EWIWCDGPRNNPGRDSVFRPIRLNSNNQEIALMNMLQGRYCQRWPWGTYDCLTASSGNIPLTVMRVGEAIRERRITDIVYRIDEARVHGKVPISRRQSVENLGP NEAPQNVEFTYTEMTESTFSSHTWKISYTLRLVSLVPLKLVGTIQLSASASGSYTFNEVSRISVTDTGSVTATVPPRSKVTVMFLSQGRMDVPYSYKQRDILFDGT TRVTQLHDGIFAGVNTFVARFIIGVPELSDLSLAQDNNPSPNNIVISPVTTNTIIHLDADHDLEHEPQVPSDSDSPEINNDPEPLPTSKL</p>		
Uncharacterized protein LOC104887222 [<i>Beta vulgaris</i>]	90%	43%
No existe similitud [<i>Arabidopsis thaliana</i>]		479 aa

Gen <i>Zn Finger</i>	Isotig: 16023	813 pb
<p>TCAGTATTCCGCACAAGGCAGGTCCGGGTGGGAGGTTTTCTTTTTCTTGAAAGATGTGGACAAATCATACCCATTCCCTCAAGGAGGAGTAAAGAGAGATGTG CGCAGTCAAAAAATCCCCAATTGATATCTGCGCCTAGTCGGGTGCAACCCCAACCATCTGTTCCACATGAAGATGCTCTATCCATTGAGCCACAAGCGCTTT TGATGACCAATGTTTTATTAGACTGAAAAATAAAACCATTTCACTAGATATCAGTTAGAGAAAAAATATCGCTTTTTAAAGGTTCTGGGTAGATATGTTTAAATCA GATTATCAAATCAATTTGAGTCAGATGATTCAGGTTGGTTCATAATTAGGTCTTGTAACCACACTGATTTTAAAGATGATTGTAATTCATTTTGGAGTTAGGTTAA TTACAAGGCAGTCAAATATCGGAATTTAAGATTTGTTTTGAACATCTTAATTATTCTTGAGTTTAAATTATCACCTAGCGTCTCCCTTGCTTTAGCCTAGCCTTTAA TAAAAACAAGTTATGAGTGCTCATACTTGCCAATCCAAAGAATCAATCTAAAACATCAAAAAAATTGATCCCATGTGTATATATCAAATTATGTGAGTATATAGTT AATTATTTTATATGCAAAATTTCAAATTTTAGTAAATTATATAAGATATTTTTAGATTCCAAAAGATTTGATCCCATGTGTATTATGGTTGAGTTCTAAAATATT AGTTGGAAGAAAAAGTTTTTTTTATTTAATCTATATTATGAATCCAATTACTTTTTAGTTGGTTATATGATATACTTCCCTCCGATTTTTATTAGTTGCTACAGTTCC GTAGCAACTACTATTCACCAATTGATGTTATTTGATTTATAGTTCTCTATGTATAATGTAAAACATAGTCAAGTGGGATCTTATTTGATTTCGTCTTAATGTGATTTT CTTAATATTAACTTTTTAGAATTTTTATCATATGAAATTAGAGATATTAAGATTAATAAGTGCATTGAATAGCGTGAAAAACAGAAATGTAGCATCTATTAATAAA CCAGAGGAAGTGTATAGTAAAAAAAATTGTAGTTTGAATTTATATGGACAAGGTTATAAACAGAGTTGTTAATGAATACTTGTCTGTTAGATTAAGCTTTTGTGCG AATTGATTTTTTAAACAGATTTTTTAAATATGAACACCAAGCTGGGATAATTTTTGGAAAATTTACGTGGGCTAGAAATATCTCTACACATAAATAACTCGTCCAAC CAATCTTTTATGTGGATTTTAAATTTTTTTTTGAAAAATAGAATATTTTAAATTTTATGATTAACTTTTTAAATTTTAACTTTTATCACTTTTGACTTAGCTTATGAA AGTAATAACGTACCCCTTAAGCTCAAGCTACAAAATTTATAGTATGGTGAGTTATTAATTAAGACACATTACATATTAATTAACACGCATCTAATAAAAAAT</p>		

AATTGTATTATTTAACTATATATTTTCCTTTTAAAAAATAATTA AAAAATTTGTTAACTATAAGGCTCGTCCATTAAGCATGTCAGACTTAAATATTTACGCGCTTACAATTTTTCTTTATTTATAATAATAAAAACAATTCAAGAAAAATTA AATTA ACTAAAATGCCATTAGTTGTAATAATCTTTTTTTCTTTACTTCAAACCATTCAAACCA TTAAGGGACTAACATTATTTTTGTTAAATTTAATTACTTTCAAATTGTCGTGACAATCAAATCTTGTACGATTAAAGCATAGACCATAGAGTAATAATATGGTA ATTAACAGTCACTATTGCAGTAACAATAAAGTAATAATCTAATAAAAATGGAAGTGATCGATGCAGTCATTGGTTAAATTATAAGATATCCCTTGATACGGCCAAA ACGTTGTTTTTACATTATTACAACACAAAATAATATCAATTCGCTTGTTTTAAAAATCTTTACAACACGATCGCTACAATGCAACCATATTATTTTACGATTCCATG GATCGGACCACCTTAATTCTGCAGGTAAGATCATAGGTTGAAATATTTCCCCTACTTCTTTCTTTTAAACCCTTTCACTTCTCTCAGTTTACCCTAAACTCAAAAA TAATTATTA AAAACAATTATTA AAAAGTATGCAATAAATCCCAATATAATTTGGATTACAAAATTAATAAATTAGCTAGTCTCTCTATAAATTGACTAGATTGAAAA TAGCTAGTGAGCTGCGAAAGTTAGAGTGTACACACAAAAGTATTGATTAACAAAGATGGGCAGCCAGAAATACGACGATGATGAGCAAATTGTTGCTAATGCT ACTAACGATGATGACTCTGGCAAATTTGGTGGTTCATTATTTGATGTTGGAAAAGTACCACTAAAATTCGACAATGAACCGGAAGTACCAATTGAAGACAACGAA TACAAGTTGTTAATTGAACTTATGGGACGAGGAACAGGAAGTATAGGTTAGGAGCCGATATTGTAATGGTTTTAGACATTAGTGGAAGTATGCAAGGTGAGAA ATTA AAAAGAAATGAAACGAGCCCTTCAATTTGTGATCAAGAAACTTAGTCCATCGGATCGTTTATCGGTTGTTACTTTCTTCCGATGCCGATAGAAAAGTGTCC GTTGCGACAAATGACTCAAAAAGCTCAAGAAGAAATTGATTTTTGGTGCAAAATTTGAGTGCTGACGGTAATACGAATATTACCGCCGGCCTTCAAAGGGGT TGA AAGTGCTTGACGAGCGCAAGTTCACCACTGGCGTTCCGGGGCGATCATGCTTATGTCGGACGGTGAACAAAATCGGGTGGTGATGCAACCATGGTT CTGTTGAACTGTTTTCCCGTGTTCACTTTTCGGTTTTGGATCTGGTGGAGAGTATGACCCCAAGTAAGTAGAAGAGAAAAAGTTACCACTAAAATAATCAAAGTTT ATGCTGGAAATTATCCACAACAAGGGATGATTC AACCGGGCTGTA ACTGTAGCCGATTCTGGGAATTTAACGAGACCAATCCTCGCGTTTTTTCGAGTAACC CGATCCAAAACACCGGTAACAAAACAAAGCGACGCAGCTAAAGCAGAGATACAACGAGTAGAAATCGTCGAAATTATGAAAGAAGCAAGAAATCTTGCTGATCA AAACA AATTCGACGAGGCTCTCGATAAGGCTGTCGAAGCTCAAAACTTGCTCGACGATTTTCGATCTTAAGAAACCTAACCAAGTTATCGAGACATTA AAAACTCG AAGTGAATGAAATGGTTAAGTTTCTACAATCAGAAGAAACATACAAGCTAAAGGTGCTTCATTTACTTATTCGTCTGAAACATCTCATGATCGACAACGTTTTGC TTCAAGAGGCGATGTTGAAAAGATACGTCCATTCGCTATTCGCGTATGGACGATTATCTCGAACAGGCTAAGGCCTTCGAGAAGGACCCGACTAAACCGGTT CCTACGGCTGCCGAAGATGAGAAGAAAGAACTCGCGGCTGATCCGCTTGGCGCTGTTTACCATCTATCAGTTATTACCTTGCGATCGCTATTGACGCTCTTC AAAATATCAAGAAAATCGTCGATCAGAAA TAA TAAGGTCATAAGATCGAATCTCATCTGATCCTACCTTTTTATCAAAAAAAGTTAGTGATGTGTTGTT ATTTTTTTCTTGTTGGGTTTGTACTAGTTTGAACTTTGCTTTTGGTTTGCTCATTCTCCTTTGTTGGAATAAATGTTTGCAATATGTTGCGGATGAT TTTAATTATGATGATTG

5'→3'		270 aa
<p>MLMSDGEQNAGGDATMVSVERFPVFTFGFGSGGEYDPKVSRRKVTTKIHKVYAGNYPQTRDDSTGAVTVADSGNLTSTNPAVFRVTRSKTPVTKQSDAAKAEIQR VEIVEIMKEARNLADQNKFDEALDKAVEAQNLLDDFDLKKPNQVIETLKLEVNEMVKFLQSEETYKAKGRSFTYSSETSHDRQRFASRGDVEKIRPFAIPRMDDYLEQA KAFEKDPTKPVPTAAEDEKKELAADPLGAVSPSISYLAIAIDALQNIKKIVDQK</p>		
Uncharacterized protein LOC104891771 [<i>Beta vulgaris</i>]	100%	57%
No existe similitud [<i>Arabidopsis thaliana</i>]		535 aa

Gen <i>DUF3407</i>	Isotig: 14119	1170 pb
<p>TAGTCGGAACATTATTTGATGTCTATTATATATATTTTTTTGCGTTTTGTTTATTTTATTATTGTGATAGTTTAAATTTTAAAAAATAAAAAAAGTGGTCAAAT TGTGGTCAACATCGTTGACCACATTTGACCAGTTTTTTTATTTTAAATTTAATTTGTTCTCCGACTAACTACCGACTAAAATGTAGTAGGAGAATAGTCGGTACAA TCGTAGGTTTTATTTAATTTTATATTACTCCGACTAACTACCGACTACTTAGCTACTAGATGGTAGTCGGGATCCGAACCGCATTTTTTGATCAAGTTTTTGGT CAAACTAAGTTTTGACGTTTCCA ACTACGATGTAGTCGGTAGGTAGTCGGAATACATAATTAATTTTTTTCTAATTTGGAAAACTGCAGTGCATTCTAAAACGC AGCGACCACTGTCCGACTAGATGGACAGTCGGTAAACAGTCGGTATATTGCGACTGTTATCTAGTAGGTACATGGTGGTGGTGGTACTATGTTGCGACTAA</p>		

ACGTAGTAGTCGGAAATGCGACTAATCTGCGACCAAGACCAAAATCGTCGGAATTCGACTATATTTGCGACTATATTGGTTTACCGACTATTCTATAGCGACTA
TTCGTGTTTAGTCGGAGATTAGTCGATATAGCTCAATACCGACCAATCACCGACTATTTATGGCAGTCGGTAACATGCGTTTTTTTTGTAGTGTAGGAAAATCAC
AAAATTACAATGTGCGACATTAGAACCCAAACTTCAAGATCTTTGCAATGATATACTCCCTCCTATTGCGCCAATGTGTCCCATTGACTTTTACCATTTTTCGG
TGGTCAAATGGGATCACATGTGAAAGAAACAAGTGCAGTGTAAAAAATTTAATAAAGGGTAAAGTAGGGTAAATAGTTGTAAAGTTGTGAAAAAGTTGAGTTT
TAAGGGTAAATTGGTAACGTTAATATACAAAAAATAAAAATGAGACATTTAAGATGACTTGACTAAAATTGAGACACTTAAGGTGAATAGGAAGGAGTAATATAG
CCCAATTCGGTAACCGAGCGAGAAATGACAATCGTTAAGGTTTTCTTTATGCTGAATTTAGATACATGTTTCATTCTTTGAACATAACTTTTTATGTAAAATCGT
ATTAATGCAAGATTTATGTCATTTGAGTCGCGCGTTTTACGCGACCATACCATGGTCCGGTTCATGCGCGACTGGTGTTAAAAATCACTACAAACGTTAAACGAT
CGTCATTAATTTCTCGTTTCGATTGTTGGAATCGAAAATATGAAGTATGTCGTTGGAAGCTCTTCAAGTCTAATTTCTAATGCTTCAAACCTTGCATTAACGAT
ATTTGTATAAAAAGTAATGCCCAAAAGATTGAACATATATCAAAATTAAGCTTAAACTATCGTCATTTTTCGTGCGATAATCGGAATTGGGTATATAATATATCATT
GAAAAGATCTTGACAAACTTTGCAGTAGTATGATTTTCTATCAAAAGTTTTGGCCAAAAAAGAAAATTTCAACAAAAAATGTGTATCTAGGTTTATTTTTCGATT
TAATAAATTGTTTTCTATTTTTAAATTAATATATTTTTACTTAATTATTATAATAAATTTTATTTCAGTAATTATAATGATTGATTTTTTATTAATAAATAAATTT
AAGAACATTTTGAAGATTATAGGGAAAAAAGTGTAGCCTTTGTCCTATATATTTGATTTGTAAATTTCAAAAACAAAAAAGAAGATATTTTGACTTGTATTGT
CCACCGAACCGAACCTGTTTTTCAAACCCCTCTTAAACCCCATCGTATTATCTTCAGAAATTACATCCAGAATTAGGGTTTCTCAAAAATCGCGACTTCTCAA
AAAATCCTGGCTCTATCTCGAACTCTTACCACCAAAACCCATCAAAACAATCTCTGGCATCAATCCTTTTATCTCGTACTTTCTCTTCTTCTCAGCTAAACCATCGT
CTTTCTCTAATCCGCTCTCCCTCGCTCCCTCAATCGCCATCTTTGCTCTTCTACTTCTGTCGAGCTTTTCTCAACTCAAGATTCTCAGACTTCTTTGAA
TGATAATAACCCTAATTGGTCCAATCGTCTCCAAAAGAAACTATCTTACTTGATGGCTGTGATTTGAGCACTGGCTTGTGTTTACAGATAACCCCTGAAAA
TGCCACTCGTGATGAAATTATTGATTCTTATATCAAAACGTTAGCACAAAGTTGTTGGAAGTGAGGAAGAAGCAAGAATGAAAATTTACTCTGTTTCCACTAGGCA
TTACTTTGCTTTTGGAGCCCTGGTGTCTGAGGAACTGTCTTACAAGCTTAAAGAGTTGCCAAATGTTGTTGGTCCCTCCCTGACTCATACTGGATGTTAAAAA
CAAAGATTATGGAGGGGAACCGTTTATCGATGGTTCGAGCTGTCCCATATGATCCCAAGTATCATGAAGAATGGGTTCAGGAACAACGCAAAGGCACAAGAGAGG
AATAGACGCAATGATAGACCTCGTAATGCTGATCGTTTCGAGGAATTTTACAGAGAAGACAAGGAGGGAGTCCAAACTACCAGAATCCTGGAGCAACTAATATGG
TAGGTCCTGGAACCTACAGGCCAGGTCCGCCAAATGCTGGTGGCCACCACCTAACATGCCACCCAACAATGCTGGCTATGCGCAAAACATGCCACCCAACA
ATGCTGGATTTGCGCAAAATATGCCACCCAACAATGCTAGATATGCACAAAACATGCCACCCAACAATGCTGGCTATGCACCAATATGCCACATCCCAATGCT
GGGCATGCACCCAATATGCCACATCAAAATGTTGGGTATGCACCGAATGCACCACATAATAATGCTGGTTATGCACAAAACAATCCTGGATTTGCTCAACCTCC
TCCCAACTACAGAGGCCAGGGAAATCCTGGTTCTCAGACAGGTGTGGGAGGTGAGCCTGGTGGAACCTATCAGCCTCAAGATGTGCCTGGACGAGATATGCC
GAATTATAGTGATCTAGTAGCTAATTTGCTTATGTCTATAGTTTGCCTATGACATTTTTTTTTGCGCCCTTTCAACTATAAAGTCGTGGAACCTATCT
GCTGTGATAGTTAAAATCATGTTTGTGTTGAACATTAACCCTTTCATCTTTCAAATGTCTTTTGTTCATTCAATGATATTCCTCCCAATTTGCA
TAGTTTGGAAATGAAATTCACACTACAGTTGAAAACATTTAATAAGCTTTTCTTTACCTTGTAGGCTTGTACTAGGAAGCATTCAACGAGCTAATTGC
CCAATATCAACAGCAGTCAAAGTTAAAAAATTATTGTAACATCATTACCCTCAACTCCGACCAGCTCAATCAAGTATACATTGACCCATTCCGT
CCAAAGAAAAGAGTACATTGACCTAGGGATGTCAATGGGTTCGACTCGGCTCGGATTATACATACTCCGACTTTGCTTCGGATAATAGTTGGAG
TTTTTTGTTCCAGTCCACCTCCACTCGGAGTCGGATTATGCATACTCCAAGTTTGCCCCGATTTCGGACTCTCGGACCTC

5'→3'		389 aa	
MATSQKILALSRTLFTTKPIKQSLASILLSRTFSSSAKPSSFSLIRLRPLASSIAIFRSSTSVRAFSTQDSQTSLNDNPNWNSNRPPKETILLDGCDFEHWLVVTDNPPEN ATRDEIIDSYIKTLAQVVGSEEEARMKIYSVSTRHYFAFGALVSELSYKLELPNVRWVLPDSYLDVKNKDYGGPEFIDGRAVPYDPKYHEEWVRNNAKAQERNRRN DRPRNADRSRNFDRRQGGSPNYQNPATNMVGPYRPGPPNAGGPPPNMPPNAGYAQNMPPNAGFAQNMPPNNARYAQNMPPNAGYAPNMPHPNAGH APNMPHQNVGYAPNAPHNNAGYAQNNPGFAQPPPNYRGQGNPGSQTVGGQPPGGTYQPQDVPGRDMPNY			
Hypothetical protein BVRB_4g086130 [<i>Beta vulgaris</i>]	59%	78%	239 aa
Cobalt ion binding protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	91%	54%	395 aa

Gen 3844	Isotig:03844	563 pb	
<p>TTTTATCCCCTCCAAAAAATCTACATCCCCCGTCGTATACGCCATTCACAAAATTAACCAAGACTTTAAAGATTAAGCCCTAACTTTACATTTACTCGTCAAAGT CGTCGTTTTTAGTGGCTATATATCAACTCCATGATCCACCATTCCCCTCCACACAAAAAATCACCATGAAACGCGTCGTTTTCTCCTCCTCTTTTCATCTGCTTC TTCCTTCTTTTACCCTCTCTAATGTCTCCGCGTCATCGACTTAACCCAAGTTCATGATCATCACCACCTTCAAACAACCTTCATCAGACGGTTCAGATTCTT CTAAATTCATCTTCCCACAAAGTTATCCTCTGTACCCGAGGCCAAATAAACCCGAATTTGAACCCGAATCCACAGAAATCGAGTTCAAAGAAGTAATAGAAGAAG TTGAAAAAACCCATAATGTTGAGTACAACCTACATGGATGTGATGAACCCGGCACCCGGTTCGGATAAACGCGTTTAAATCGGTTTTCTTACCGATTATCCGGGTA AAGTCGCATGGTTGTGCGACAGTTTACCAGGCTCATGCATCACCCGACCCGGTTTATTGAGGCTAATGAAGTTGGGTTTGCTACAGTTGAGGAGAATAACCACG GTTACATCATCATCACCATCATGATCATGTTGAGGAGGATGATCAGGCGGCTGAGATGATGACAGAGATATTGGAGGAGAAGAAGGATAATAAAGATGAAAT GAAAAGGAACCTACAGAAAGATTTGTTGAAGATTGGCAAGTCTTGGGTTATAATTACTTTTAAACGAAGAAAGTACTGGAAATTAATCTTCTACTATGGTGGCAG AAATGCAGCGACTTACGCTAAAATAAAGATAATTTACTTTGGATCATTAAATGTATAATATATGATAGATTTGTGATCTTACAGGATGTTTAAATGGTAAACTATGGAA GTTGGAAAGTTGCCATGTGATGAGGATCGGATGTTATACATGATATACACTCCTCTATCTGTATGATACCTTAAAGGGTGTTCATTAGTAAAATATTTTAAATG GACACACGTAGTTTATTGACAAATTTAGTTTATTTTGGTATAAATCGATAGCCGAGCATTTCAAAAAATAAATTGATAGTTGAGCGGTCAAATCATCTAGATGC TAATGTTTGATAAATTAGTTTGTGAAACAGTTTGTCTTGTGAAGTAATAGGTCCTCTTAGCGTGTTTAAAATTAATTTTGACAAAACCAAT</p>			
5'→3'		113 aa	
MDVMNRHPVRINAFNRFSLPIIRVKSHGCRQFHRLMHHPDRFIEANEVGFATVEENHGHSHHHHHHDHVEEDDQAAEMMTEILEEKDNKDNENEKELQKDLLKIGKFLGYNFY			
hypothetical protein BVRB_5g098960 [<i>Beta vulgaris</i>]	84%	33%	210 aa
No existe similitud [<i>Arabidopsis thaliana</i>]			

Gen 03240	Isotig: 03240	306 pb	
<p>TTATTTATTTATTTATCACATTTTTTAAATTAGGTTAGTTAATTTAATTTGTTCAATATCATTTTGTGGTAATGTCGTATTTAAAATTTTAGCAAATAAGAGTAATA GTTGTTAATTTTGCCAATAAAACTGTCGAAATCTCGTCCACTAGTTGGTGCCCCCTGAGACTCCGGACTTTGGATCCGCCACTGAAGAGCCTTAACTACAACT TAAACTTTAGTTTGTGTTTTCATAATAAACATGTTAAATTTGTTGTAATTCATATAATAGACCACATATATTATGATTAGCACTAATAAACCTAAGTTTATGTGTG TATATATGTACGCACGTGAATAAATGCAGGTTACAACCTTTTTAGCATTTTTGGCATTTCGTAATGACAAGTATTCTAAGCAGCCGCTACTATTTATCATTATCAA GTAGACGTATAAAACCCGACGGAATCGTTGGATTAAAGTTGGTACGAGGTTGCTATATCCCACGGGGAAAAGTTTTCTTTTATCCAACCTTTTGGTGCATAATTA CACTAACTTTAAGCCTACGTTCTTACGCTATCTCGGCGAGTACTTCTGAGGCTCAACATAGAAATGTTTATCTACAAGAACTGCTGGTTATGACGTTGGTGTG CAATGGGACAACCTCATATGAGTCATGTGCAATTGTCAAAGGACCAATGTGATGTTAATAGTATTATTATAATTATATGTATAAAAGTAAAGAGGTAACCGTGTA TTTTGAGTTTATGATTTTTAAATATATATATATATGAAATATGTTATCTAGAGATTGAATTTGACTGCAATTTATGAAAACGCTATTGAAATATGGACTCTTG AAAACCTGAATATGTATTCTGAT</p>			
5'→3'		101 aa	
MTSILSSRYLSSRRKIPDGIVGLKLVRCYIPRGKVFLYPTLWCIITLTLRLSYAISASTSEAQRNVHLQETAGYDVGVMGQPHMSHVQLSKDQC			
putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial [<i>Beta vulgaris</i>]	58%	30%	613 aa
No existe similitud [<i>Arabidopsis thaliana</i>]			

APÉNDICE 4. Expresión relativa de los genes seleccionados

HFR												
HERBIVORÍA												
	HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ		
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	12.4	92.7	6.1	2.1	5.4	0.4	1.0	0.9	1.8	1.3	1.5	0.9
12H	7.3	462.0	11.3	2.2	20.2	0.4	0.7	0.3	1.0	2.1	0.3	1.5
24H	10.0	11.6	0.0	0.5	0.3	0.0	1.2	0.8	0.5	1.6	0.3	0.8
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTA												
CT	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	12.8	1.0	1.0
6H	1.6	1.0	1.5	0.6	1.4	1.2	1.4	1.3	1.3	2.2	0.2	0.1
12H	0.3	0.2	0.1	0.0	0.0	0.1	6.5	3.5	18.9	3.1	1.0	0.1
24H	0.2	0.0	1.1	0.0	0.0	2.5	3.4	0.3	1.0	4.1	0.1	0.1
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTA												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	1.7	0.4	0.9	1.8	1.0	1.4	1.7	1.0	1.8	1.1	2.1	0.8
12H	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	19.1	0.3	0.0	2.4	2.5	46.1
24H	0.4	0.0	1.1	0.0	0.0	0.5	0.1	0.3	1.4	1.0	3.3	3.7
SALINIDAD												
	HOJA			TALLO			RAIZ					
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
4d	0.4	0.3	0.2	0.4	1.9	6.2	4.4	3.4	3.1			
7d	0.4	0.1	0.0	4.7	5.4	3.2	0.3	1.6	1.6			
9d	0.2	0.6	0.1	1.1	11.2	15.6	75.9	10.2	11.2			
DEFOLIACIÓN												
		V1		V2		EP		FL				
		CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT			
	HOJA	1.0	5.2	1.0	17.5	1.0	16.1	1.0	0.8			
	TALLO	1.0	13.6	1.1	1.2	1.0	0.8	1.0	1.5			
	RAÍZ	1.0	1.6	1.0	3.9	1.0	4.5	1.0	1.0			
	PANOJA					1.0	0.7	1.0	0.8			

ERD7												
HERBIVORÍA												
HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ			
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	1.1	0.8	0.5	0.6	1.3	0.5	1.4	0.7	1.8	2.5	0.9	0.8
12H	1.5	1.4	1.7	1.1	2.1	1.3	0.7	2.2	2.4	2.5	1.1	0.9
24H	1.6	1.4	0.8	0.7	6.1	0.7	1.7	0.8	1.9	1.7	0.8	0.8
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTA												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.9	1.0	1.0
6H	5.2	3.0	1.1	0.6	0.6	0.7	2.1	0.5	0.7	1.3	0.1	0.1
12H	19.3	7.8	2.5	2.4	1.6	0.6	1.3	1.4	0.9	1.5	0.2	0.2
24H	56.5	11.0	3.4	0.6	1.9	0.4	2.0	0.6	1.0	1.2	0.1	0.1
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTA												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	2.5	1.7	1.3	1.7	0.8	0.8	1.2	1.6	1.2	2.6	1.6	0.5
12H	6.9	0.9	0.1	2.5	1.6	1.0	0.9	4.6	2.3	2.9	1.3	0.5
24H	1.3	3.2	0.7	0.9	1.8	0.7	1.2	2.8	1.4	0.7	1.2	0.5
SALINIDAD												
	HOJA			TALLO			RAÍZ					
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
4d	3.9	14.1	0.4	1.1	1.1	13.7	0.5	0.3	0.9			
7d	5.1	2.2	0.1	1.1	2.6	8.6	0.3	0.7	0.5			
9d	7.0	0.5	0.2	0.7	0.5	11.7	2.1	0.6	0.8			
DEFOLIACIÓN												
	V1		V2		EP		FL					
	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT				
	HOJA	1.0	2.2	1.0	1.4	1.0	8.7	1.0	0.7			
	TALLO	1.0	1.2	1.0	0.8	1.0	0.9	1.1	0.4			
	RAÍZ	1.0	0.8	1.0	1.6	1.0	1.4	1.0	1.0			
	PANOJA					1.1	1.0	1.0	0.4			

Zn Finger												
HERBIVORÍA												
HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ			
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	5.9	4.7	4.9	2.1	3.0	4.0	1.6	1.1	2.0	2.9	2.1	2.8
12H	2.0	5.6	6.2	1.9	3.1	5.7	0.9	2.8	2.3	3.2	1.5	4.5
24H	2.7	1.1	0.5	0.9	0.8	2.7	0.6	0.7	1.7	0.8	1.2	1.4
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTA												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.9	1.0	1.0
6H	1.2	0.8	1.2	1.8	0.8	1.0	1.8	0.5	0.9	2.0	1.1	0.1
12H	1.0	0.3	0.6	0.6	0.4	1.7	0.6	0.5	0.8	0.7	1.8	0.1
24H	0.4	0.6	0.2	2.2	0.0	0.4	0.5	0.6	0.4	1.1	1.2	0.1
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTA												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	0.7	2.5	0.6	1.2	0.6	0.6	1.3	1.6	1.6	2.6	0.8	0.7
12H	0.5	0.5	0.0	0.5	0.4	0.7	0.4	1.4	0.7	3.2	0.9	0.8
24H	0.6	2.9	0.2	1.4	0.8	0.4	1.0	1.0	0.7	1.0	0.6	1.1
SALINIDAD												
	HOJA			TALLO			RAIZ					
CT	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
4d	0.6	0.2	0.2	0.3	1.2	19.2	1.5	0.9	8.9			
7d	0.4	0.3	0.2	1.7	2.1	14.0	3.4	1.1	121.0			
9d	0.4	0.2	0.2	0.8	0.8	17.6	1.8	5.0	10.0			
DEFOLIACIÓN												
	V1		V2		EP		FL					
	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT				
	HOJA	1.0	7.2	1.0	16.7	1.0	24.8	1.0	3.8			
	TALLO	1.0	11.5	1.0	2.4	1.0	1.4	1.0	1.0			
	RAÍZ	1.0	2.7	1.0	3.2	1.0	2.5	1.0	0.4			
	PANOJA					1.0	1.5	1.0	0.6			

DGR												
HERBIVORÍA												
	HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ		
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	1.3	1.7	0.8	0.5	1.1	1.8	1.1	1.2	0.8	1.1	1.8	0.4
12H	0.6	2.1	2.1	1.0	0.9	2.2	1.0	2.1	0.8	2.2	0.6	0.3
24H	0.8	2.8	1.8	1.7	1.7	2.1	0.6	2.1	2.8	0.9	0.5	0.3
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTE												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0
6H	1.3	1.0	1.3	2.1	0.8	1.7	1.2	1.0	0.9	1.4	0.7	0.6
12H	0.7	3.2	1.2	1.0	1.9	1.8	0.9	2.3	1.1	0.8	0.9	0.7
24H	0.0	0.4	0.3	0.8	0.0	0.9	0.5	0.5	0.8	1.5	0.5	0.4
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTE												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	0.4	0.5	0.6	0.8	0.5	0.8	0.6	1.1	1.4	1.1	0.9	0.7
12H	0.3	1.4	0.0	1.3	1.5	0.8	0.2	1.1	1.0	2.2	0.8	0.2
24H	0.4	0.6	0.3	0.4	0.6	0.8	0.5	0.8	1.1	0.9	0.2	0.5
SALINIDAD												
		HOJA			TALLO			RAIZ				
	CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	4d	0.3	0.0	0.1	0.4	0.2	7.7	1.1	0.2	2.7		
	7d	0.4	0.4	0.1	1.4	0.6	8.8	0.6	0.6	34.4		
	9d	0.5	0.4	0.0	0.5	0.6	8.2	1.2	2.9	3.8		
DEFOLIACIÓN												
		V1		V2		EP		FL				
		CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT			
	HOJA	1.0	1.9	1.0	1.9	1.0	12.7	1.0	1.7			
	TALLO	1.0	2.9	1.0	0.5	1.0	0.8	1.0	2.4			
	RAÍZ	1.0	0.2	1.0	0.3	1.0	1.8	1.0	0.3			
	PANOJA					1.0	0.8	1.0	1.9			

DUF3407												
HERBIVORÍA												
	HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ		
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	1.1	1.0	1.3	0.7	1.0	0.5	1.2	0.6	1.6	0.9	0.8	0.7
12H	0.8	3.3	2.5	1.0	3.1	0.8	0.7	2.4	1.8	1.1	0.6	1.0
24H	2.3	1.0	0.4	1.0	0.6	0.3	1.0	0.3	1.3	0.9	0.5	0.3
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTA												
CT	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0
6H	1.6	1.4	1.6	0.6	1.3	0.8	1.4	0.7	0.9	0.8	0.7	0.1
12H	2.0	1.3	1.1	1.1	0.5	0.4	0.7	0.6	0.5	0.7	0.9	0.1
24H	7.9	1.0	1.2	0.3	0.4	0.3	1.8	0.7	0.8	0.9	1.3	0.1
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTA												
CT	1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	0.7	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.1
6H	1.1	2.4	0.7	1.2	0.9	1.0	1.2	0.6	1.9	0.9	0.8	0.8
12H	0.8	0.8	0.0	0.8	0.4	0.4	0.4	0.9	1.0	1.2	1.5	0.7
24H	0.3	2.7	0.8	0.3	0.3	1.0	0.8	0.5	1.4	1.1	1.1	0.9
SALINIDAD												
		HOJA			TALLO			RAIZ				
	CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
	4d	0.9	2.0	0.1	0.9	1.5	19.3	1.1	0.8	1.2		
	7d	1.2	0.9	0.0	1.6	2.4	9.1	1.1	0.7	0.9		
	9d	1.4	0.9	0.1	1.0	1.6	14.3	1.1	2.1	1.5		
DEFOLIACIÓN												
		V1		V2		EP		FL				
		CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT			
	HOJA	1.0	2.3	1.0	2.6	1.0	10.6	1.0	0.6			
	TALLO	1.0	3.1	1.0	1.0	1.0	1.3	1.1	0.2			
	RAÍZ	1.0	0.5	1.0	0.6	1.0	1.3	1.0	0.3			
	PANOJA					1.2	1.0	1.0	0.4			

DUF3407												
HERBIVORÍA												
	HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ		
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	1.1	1.0	1.3	0.7	1.0	0.5	1.2	0.6	1.6	0.9	0.8	0.7
12H	0.8	3.3	2.5	1.0	3.1	0.8	0.7	2.4	1.8	1.1	0.6	1.0
24H	2.3	1.0	0.4	1.0	0.6	0.3	1.0	0.3	1.3	0.9	0.5	0.3
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTE												
CT	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0
6H	1.6	1.4	1.6	0.6	1.3	0.8	1.4	0.7	0.9	0.8	0.7	0.1
12H	2.0	1.3	1.1	1.1	0.5	0.4	0.7	0.6	0.5	0.7	0.9	0.1
24H	7.9	1.0	1.2	0.3	0.4	0.3	1.8	0.7	0.8	0.9	1.3	0.1
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTE												
CT	1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	0.7	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.1
6H	1.1	2.4	0.7	1.2	0.9	1.0	1.2	0.6	1.9	0.9	0.8	0.8
12H	0.8	0.8	0.0	0.8	0.4	0.4	0.4	0.9	1.0	1.2	1.5	0.7
24H	0.3	2.7	0.8	0.3	0.3	1.0	0.8	0.5	1.4	1.1	1.1	0.9
SALINIDAD												
		HOJA		TALLO			RAIZ					
	CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
	4d	0.9	2.0	0.1	0.9	1.5	19.3	1.1	0.8	1.2		
	7d	1.2	0.9	0.0	1.6	2.4	9.1	1.1	0.7	0.9		
	9d	1.4	0.9	0.1	1.0	1.6	14.3	1.1	2.1	1.5		
DEFOLIACIÓN												
		V1		V2		EP		FL				
		CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT			
	HOJA	1.0	2.3	1.0	2.6	1.0	10.6	1.0	0.6			
	TALLO	1.0	3.1	1.0	1.0	1.0	1.3	1.1	0.2			
	RAÍZ	1.0	0.5	1.0	0.6	1.0	1.3	1.0	0.3			
	PANOJA					1.2	1.0	1.0	0.4			

3240												
HERBIVORÍA												
HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ			
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	0.7	3.4	0.6	3.2	1.3	0.6	1.5	6.4	2.1	1.1	1.1	1.3
12H	0.5	2.7	2.2	1.4	1.9	0.5	0.8	1.0	0.4	2.8	0.4	0.9
24H	1.3	2.1	1.1	0.6	5.5	0.7	2.2	0.5	0.4	2.0	0.3	0.9
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTE												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.0	1.0
6H	1.7	1.1	1.3	0.6	1.4	0.6	1.1	1.1	0.4	1.4	0.6	0.0
12H	3.2	1.0	2.2	1.5	2.3	1.0	1.1	3.6	6.4	4.8	1.4	0.0
24H	1.9	0.7	1.8	0.6	2.3	0.7	4.0	1.9	1.1	1.2	0.6	0.0
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTE												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	0.6	1.9	0.9	1.4	1.2	1.6	1.4	1.1	0.9	5.5	1.2	2.0
12H	0.7	0.5	0.1	0.7	0.9	1.1	3.1	1.2	0.8	24.0	1.7	1.1
24H	0.2	3.0	1.0	0.7	0.4	1.2	0.3	1.1	1.0	9.1	1.5	1.8
SALINIDAD												
	HOJA			TALLO			RAÍZ					
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
4d	1.4	15.9	0.1	0.5	1.3	4.8	0.5	2.7	4.2			
7d	1.3	1.4	0.2	7.1	11.8	5.7	1.1	1.4	4.9			
9d	0.2	2.2	0.3	0.7	9.6	16.0	95.9	4.6	13.1			
DEFOLIACIÓN												
	V1		V2		EP		FL					
	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT				
	HOJA	1.0	2.2	1.1	0.5	1.0	3.5	1.0	0.7			
	TALLO	1.0	2.6	1.0	16.6	1.0	0.8	1.0	9.5			
	RAÍZ	1.0	1.1	1.0	2.7	1.0	18.2	1.0	0.6			
	PANOJA					1.5	1.0	1.0	0.6			

3844												
HERBIVORÍA												
HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ			
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	2.4	3.8	0.9	1.0	1.9	0.3	2.7	0.5	0.7	1.5	1.3	1.0
12H	1.9	7.8	2.5	1.2	3.2	0.4	1.2	2.3	0.6	1.8	1.3	0.9
24H	2.5	18.9	1.1	0.2	2.2	0.2	2.5	0.9	0.3	1.6	1.3	1.1
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTE												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0
6H	2.1	0.9	1.8	0.3	1.7	1.2	2.4	1.0	1.9	1.1	0.6	0.1
12H	9.1	4.0	3.4	1.3	4.6	1.2	2.0	1.3	18.7	1.7	0.7	0.2
24H	4.4	2.1	0.7	0.2	2.7	0.4	1.5	1.8	1.2	1.9	0.7	0.1
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTE												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	1.2	3.0	1.7	0.9	1.1	0.7	1.2	3.4	0.6	1.9	0.9	1.9
12H	3.8	0.8	0.2	0.7	3.2	0.6	1.4	13.0	1.3	2.3	1.9	1.3
24H	1.5	1.0	1.8	0.5	2.1	0.5	5.0	11.6	1.5	3.1	1.9	1.4
SALINIDAD												
	HOJA			TALLO			RAÍZ					
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
4d	6.7	0.5	0.1	3.3	1.5	7.1	1.3	0.6	2.2			
7d	5.1	1.2	0.2	2.2	1.4	4.2	2.0	0.8	1.5			
9d	12.6	0.6	0.2	1.1	0.6	14.4	0.8	0.9	2.6			
DEFOLIACIÓN												
	V1		V2		EP		FL					
	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT				
	HOJA	1.0	1.3	1.0	1.4	1.0	6.4	1.1	0.5			
	TALLO	1.0	0.6	1.0	3.0	1.0	5.9	1.0	2.5			
	RAÍZ	1.0	1.3	1.1	1.7	1.0	0.7	1.0	0.1			
	PANOJA					1.6	1.0	1.0	0.5			

2880												
HERBIVORÍA												
HOJA LOCAL			HOJA SISTÉMICA			TALLO			RAÍZ			
	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau	A. Hypo	A. Crue	A. Cau
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	1.0	1.9	1.3	11.6	1.7	0.6	0.8	0.7	3.7	0.9	1.2	1.3
12H	1.3	2.8	2.8	8.4	1.6	0.7	1.0	2.5	2.8	1.7	1.5	2.2
24H	1.3	16.2	3.3	11.5	12.0	1.4	1.4	0.6	3.1	1.2	1.6	1.5
INFECCIÓN BACTERIANA AVIRULENTA												
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	3.2	1.0	1.0
6H	1.9	3.0	1.9	0.5	1.3	0.5	0.9	0.9	0.9	0.0	1.1	0.0
12H	3.4	7.3	3.4	0.9	6.1	0.9	61.7	2.3	61.7	0.1	2.6	0.1
24H	3.1	4.4	3.1	0.6	2.5	0.6	2.4	0.9	2.4	0.1	0.9	0.1
INFECCIÓN BACTERIANA VIRULENTA												
CT	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6H	0.4	2.3	1.4	0.4	1.1	1.6	1.3	1.3	1.3	1.4	1.0	0.9
12H	2.6	0.5	0.4	1.6	2.8	8.4	37.7	2.4	1.3	2.2	1.4	28.5
24H	0.5	3.3	2.0	0.3	1.3	1.9	0.7	1.4	1.7	1.1	1.3	1.7
SALINIDAD												
	HOJA			TALLO			RAIZ					
CT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
4d	0.8	17.3	0.1	1.9	0.9	2.9	0.3	1.2	2.8			
7d	0.5	1.4	0.1	1.7	1.2	3.0	0.3	0.7	2.7			
9d	1.9	0.8	0.1	0.5	2.8	10.6	6.2	3.3	5.7			
DEFOLIACIÓN												
		V1		V2		EP		FL				
		CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT	CT	TRAT			
	HOJA	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	5.8	1.0	0.5			
	TALLO	1.0	2.7	1.0	1.6	1.0	1.1	1.0	5.5			
	RAÍZ	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.5	1.0	0.6			
	PANOJA					1.0	0.9	1.0	0.4			

APÉNDICE 5. Plantas *A. cruentus* (a) y *A. caudatus* (b), después de la exposición al estrés salino durante siete días, plantas de *A. cruentus* (c) y *A. caudatus* (d) al finalizar el estrés por herbivoría



